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 Ukrain

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

Институт органической химии Национальной академии наук Украины
Institute of Organic Chemistry National Academy of Sciences of Ukraine

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

Национальный фармацевтический университет
National University of Pharmacy

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины
Institute of Bioorganic and Oil Chemistry National Academy of Sciences of Ukraine

Украинское биофизическое общество
Ukrainian Biophysical Society

Украинское биохимическое общество
Ukrainian Biochemical Society

Украинское физиологическое общество
Ukrainian Physiological Society

Научно-практическая конференция

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения

Новый Свет, Крым, Украина
23–28 мая 2011

Тезисы докладов

Scientific Conference

BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES: Fundamental and Applied Problems

Novy Svet, AR Crimea, Ukraine
May 23–28, 2011

Abstracts

mavis
PUBLISHER
Киев
2011

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. ***Крышталь О.А.***
Академик НАН Украины, д.х.н., проф. ***Кухарь В.П.***
Чл.-кор. НАН Украины, д.б.н., проф. ***Костерин С.А.***
Чл.-кор. НАН Украины, д.х.н., проф. Георгиевский В.П.
Чл.-кор. НАН Украины, д.х.н., проф. ***Черных В.П.***
Чл.-кор. НАН Украины, д.х.н., проф. ***Кальченко В.И.***
Чл.-кор. НАН Беларуси, д.б.н, проф. ***Мойсеенок А.Г.***
Д.б.н., проф. ***Чуян Е.Н.***
Д.б.н., проф. ***Береговая. Т.В.***
Д.б.н., проф. ***Темурьянц Н.А.***
Д.б.н., проф. ***Чирва В.Я.***

PROGRAM COMMITTEE

Co-Chairs:
Academician of NAS of Ukraine, prof. ***Andronati S.A.***
prof. ***Ostapchenko L.I.***

Members of Progam Comittee:
Academician of NAS of Ukraine, prof. ***Komisarenko S.V.***
Academician of NAS of Ukraine, prof. ***Kryshtal O.A.***
Academician of NAS of Ukraine, prof. ***Kukhar V.P.***
member of NASU, prof. ***Kosterin S.O.***
member of NASU prof. ***Georgievsky V.P.***
member of NASU prof. ***Chernykh V.P.***
member of NASU prof. ***Kalchenko V.I.***
member of NASB prof. ***Moisejonok A.G.***
prof. ***Chuyan E.N.***
prof. ***Beregova T.V.***
prof. ***Temuryants N.A.***
prof. ***Chirva V.Ya.***

Спонсор Конференции

BIO-RAD

ОРГКОМИТЕТ

Д.б.н., проф. ***Мартынюк В.С.*** (председатель)
Д.х.н., проф. ***Шульгин В.Ф.***
Д.б.н., проф. ***Мирошниченко Н.С.***
Д.б.н., проф. ***Кравец В.С.***
К.х.н. ***Павловский В.И.***
К.б.н. ***Цейслер Ю.В.***
К.б.н. ***Шелюк О.В.***

ORGANIZING COMMITTEE

prof. ***Martynyuk V.S.*** (chair)
prof. ***Shulgin V.F.***
prof. ***Miroshnichenko V.S.***
prof. ***Kravets V.S.***
PhD. ***Pavlovsky V.I.***
PhD ***Tseisler Yu.V.***
PhD ***Shelyuk O.V.***

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

Тезисы докладов Научно-практической конферецнии “Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения», 23 - 28 мая, 2011, Новый Свет, Украина. – Киев: Издатель В.С. Мартынюк, 2011. – 780 с.

ISBN 978-966-96879-6-8

Сборник тезисов докладов Научно-практической конферецнии “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 978-966-96879-6-8

ББК 20.1я 43 + 26.23я 43

© Авторы тезисов, 2011
© В.С. Мартынюк, 2011, дизайн, обложка

Новые технологии получения биологически активных веществ: синтез, методы исследования

New Technologies of Obtaining of Bioactive Substances: Synthesis, Research Methods

Спонсор Конференции

BIO-RAD

BIO-RAD Laboratories

Обладнання і реагенти для дослідницьких, медичних та промислових лабораторій

Компанія BIO-RAD (США) є найбільшим світовим виробником лабораторного та аналітичного обладнання. На сьогодні BIO-RAD представляє широку гамму обладнання для дослідницьких та промислових лабораторій:

- **ПЛР-ампліфікатори CFX96 Real Time**
- **Обладнання та реагенти для геном них та протеомних досліджень**
- **Обладнання для рідинної хроматографії**
- **Обладнання, реагенти і витратні матеріали для електрофорезу та блоттінгу**
- **Системи анализу зображення. Документуючі системи. Програмне забеспечення**

За додатковою інформацією щодо технічних можливостей та вартості продукції компанії BIO-RAD просимо Вас звертатися до регіонального представництва компанії в Україні за адресою:

Київ, 02160, проспект Возз'єднання 7а, оф. 315
Тел.: (050) 446-21-13, (050) 448-34-56
e-mail: office@bio-rad.com.ua
www.bio-rad.com

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ N-АРИЛ(МЕТИЛ)СУЛЬФОНИЛ-1,4-БЕНЗОХИНОНМОНОИМИНОВ С ЕНАМИНАМИ

[1]Авдеенко А.П., [1]Коновалова С.А., [1]Михайличенко О.Н., [2]Скрипец В.И.

[1] Донбасская государственная машиностроительная академия, Краматорск, Украина
e-mail: chimist@dgma.donetsk.ua
[2] Universidade Eduardo Mondlane, Faculdade de Ciências, Departamento de Química, Maputo, Mozambique
e-mail: vskripets@hotmail.com

Производные 5-гидроксииндолов и 5-гидроксибензофуранов проявляют высокую биологическую активность: нейромедиатор серотонин, а также его производное мелатонин, участвующий в синхронизации сна, являются 5-гидроксизамещенными производными индола [1]. В ряду этих соединений найдено значительное количество эффективных лекарственных препаратов с различным биологическим действием: широкоизвестный противовирусный препарат арбидол; местный анестетик, применяемый в стоматологии, бензофурокаин; антидепрессант брофаромин; один из наиболее активных нестероидных противовоспалительных препаратов индометацин; радиопротектор мексамин [1, 2].

Классическим способом синтеза производных 5-гидроксииндолов и 5-гидроксибензофуранов является реакция Неницеску, представляющая собой конденсацию хинонов с енаминами [3]. В то же время синтез аминоаналогов этих соединений – 5-аминоиндолов и 5-аминобензофуранов – изучен недостаточно. Они могут быть получены путем взаимодействия *п*-замещенных хинониминов с енаминами по реакции Неницеску.

Целью настоящей работы является синтез N-метилсульфонил-1,4-бензохинонмоноиминов и исследование взаимодействия этих соединений, а также полученных ранее N-арилсульфонил-1,4-бензохинонмоноиминов, с енаминами.

N-Метилсульфонил-1,4-бензохинонмоноимины получены окислением N-метилсульфонил-4-аминофенолов, синтезированных по реакции соответствующих *п*-аминофенолов с метилсульфохлоридом в воде в присутствии гидрокарбоната натрия. Окисление проводили 4-(диацетоксииод)толуолом или свежеприготовленным оксидом серебра в хлороформе или хлористом метилене. Строение *п*-хинонмоноиминов подтверждено данными ЯМР ^{1}H, ЯМР ^{13}C и ИК спектроскопии.

Исследовано взаимодействие N-метил(арил)сульфонил-1,4-бензохинонмоноиминов (I) с енаминами: этиловыми эфирами 3-ариламинокротоновых кислот (II) и имином ацетилацетона (III). Реакции проводили в различных растворителях – ацетоне, хлороформе, дихлорэтане и уксусной кислоте. В зависимости от строения исходного хинонимина (I) и условий проведения реакции получены: в ацетоне – продукт 1,4-присоединения 2-метил-6-[2-(4-метоксифениламино)-1-этоксикарбонилпроп-1-енил]-4-фенилсульфониламинофенол (IV); в хлороформе и дихлорэтане – 1-арил-5-арил(метил)сульфониламино-3-ацетил(этоксикарбонил)-2-метилиндолы (V); в уксусной кислоте – 5-арил(метил)сульфониламино-3-ацетил-(этоксикарбонил)-2-метилбензофураны (VI). Следует отметить, что ранее производные бензофурана (VI) в реакциях с хинониминами получить в одну стадию не удавалось.

X=Me, Ar'; R= Me, Cl; n=0–2, Y=COOEt (II, V, VI), COMe (III, V, VI).

Выполнено исследование потенциальной биологической активности синтезированных соединений (V, VI). Согласно данным программы PASS для производных 5-аминоиндолов (V) и 5-аминобензофуранов (VI) наиболее вероятным является проявление активности «Retinal oxidase inhibitor» (до 0,94), «Antiarrhythmic» (до 0,88) и «Cardiotonic» (до 0,86). В большинстве случаев вероятность проявления данных видов активности превышает 0,7, при этом для метилсульфониламинопроизводных индолов и бензофуранов она выше, чем для арилсульфониламинопроизводных. Следует также отметить, что введение как алкильных заместителей, так и галогенов в ароматическое ядро полученных соединений снижает вероятность проявления их биологической активности.

Литература:

1.*М.Д. Машковский* Лекарства XX века. – М.: ООО «Изд-во Новая волна», 1998, 320 с.
2.*В.Г. Граник* Основы медицинской химии. – М.: Вузовская книга, 2001. – 384 с.
3.*В.Г. Граник, В.М. Любчанская, Т.И. Муханова*//Реакция Неницеску (обзор) – Хим.-фарм. журнал,1993,т.27, N6, с.37-55.

RACTION OF N-ARYL(METHYL)SULPHONYL-1,4-BENZOQUINONEMONOIMINES WITH ENAMINES

[1]Avdeenko A.P., [1]Konovalova S.A.,[1]Mykhailychenko O.N., [2]Skripets V.I.

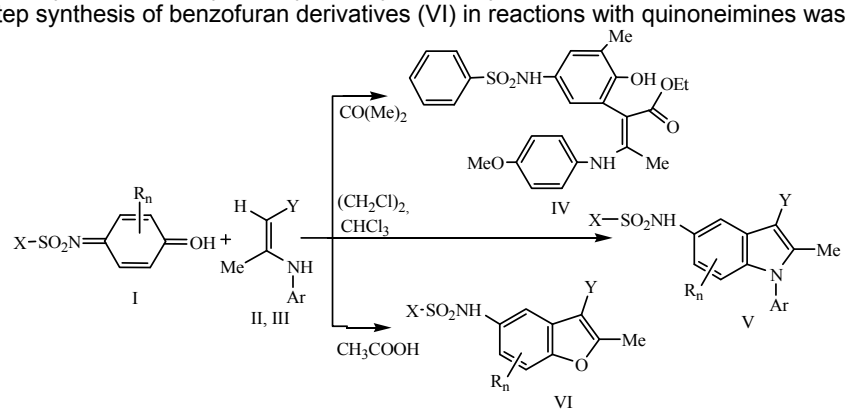
[1] Donbass State Engineering Academy, Kramatorsk, Ukraine
e-mail: chimist@dgma.donetsk.ua
[2] Eduardo Mondlane University, Faculty of Sciences, Chemistry Department, Maputo, Mozambique
e-mail: vskripets@hotmail.com

Derivatives of 5-hydroxyindole and 5-hydroxybenzofuran show high biological activity: the neurotransmitter serotonin, as well as its derivative melatonin, involved with sleep synchronization, are 5-hydroxyindole derivatives [1]. A significant number of the effective drugs with different biological effects have been found among these compounds: a widely known antiviral drug arbidol; local anesthetic benzofurokain used in dentistry; an antidepressant brofaromin; one of the most active non-steroidal anti-inflammatory drugs indomethacin; a radioprotector mexamine [1, 2].

Common method of synthesis of 5-hydroxyindoles and 5-hydroxybenzofurans is the Nenitzescu reaction – a condensation of quinones with enamines [3]. At the same time synthesis of aminoanalogs of these compounds – 5-aminoindoles and 5-aminobenzofurans – has been studied insufficiently. They can be obtained in Nenitzescu reaction of *p*-substituted quinoneimines with enamines.

The purpose of this work is the synthesis of N-methylsulphonyl-1,4-benzoquinonemonoimines and the study of interaction of these compounds and N-arylsulphonyl-1,4-benzoquinonemonoimines, obtained previously, with enamines. N-Methylsulphonyl-1,4-benzoquinonemonoimines were obtained by oxidation of N-methylsulphonyl-4-aminophenols. The latter were synthesized by reaction of *p*-aminophenols with methylsulphonylchloride in water in the presence of sodium bicarbonate. Oxidation was carried out with the 4-(diacetoxyiod)toluene or freshly prepared silver oxide in chloroform or methylene chloride. The structure of obtained *p*-quinonemonoimines has been confirmed by NMR ^{1}H, NMR ^{13}C and IR spectroscopy.

The interaction of the N-methyl(aryl)sulphonyl-1,4-benzoquinonemonoimines (I) with enamines – ethyll ethers of 3-arylaminokrotonic acid (II) and acetylacetone imine (III) – has been studied. Reactions were carried out in different solvents – acetone, chloroform, dichloroethane and acetic acid. Depending on the structure of input quinoneimine (I) and the reaction conditions it has been obtained: a product of 1,4-addition – the 2-methyl-6-[2-(4-metoxyphenylamino)-1-ethoxycarbonylprop-1-enyl]-4-phenylsulphonylaminophenol (IV) in acetone; 1-aryl-5-aryl(methyl)sulphonylamino-3-acetyl(ethoxycarbonyl)-2-methylindoles (V) in chloroform and dichloroethane; and 5-aryl(methyl)sulphonylamino-3-acetyl(ethoxycarbonyl)-2-methylbenzofurans (VI) in acetic acid. It should be noted that one-step synthesis of benzofuran derivatives (VI) in reactions with quinoneimines was failed earlier.



X=Me, Ar'; R= Me, Cl; n=0–2, Y=COOEt (II, V, VI), COMe (III, V, VI).

The investigation of potential biological activity of synthesized compounds (V, VI) has been carried out. Activities «Retinal oxidase inhibitor» (up to 0,94), «Antiarrhythmic» (to 0,88), and «Cardiotonic» (to 0,86) for derivatives of 5-aminoindole (V) and 5-aminobenzofuran (VI) according with the PASS program data is the most expected. In the most cases the probability of these activity types is more than 0.7. The probabilities of activities for methylsulphonylderivatives of indole and benzofuran are higher than for phenylsulphonylderivatives. It should also be noted the introduction of both alkyl substituents and halogens in the aromatic ring of these compounds reduces their potential biological activity.

References:

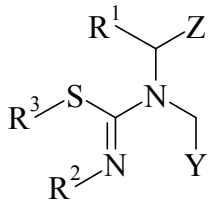
1.*М.Д. Машковский* Лекарства XX века. – М.: ООО «Изд-во Новая волна», 1998, 320 с.
2.*В.Г. Граник* Основы медицинской химии. – М.: Вузовская книга, 2001. – 384 с.
3.*В.Г. Граник, В.М. Любчанская, Т.И. Муханова* // Реакция Неницеску (обзор) – Хим.-фарм. журнал,1993,т.27, N6,с.37-55.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ QSAR И QSPR ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЗАВИСИМОСТИ "СТРУКТУРА-СВОЙСТВО" РЯДА ПРОИЗВОДНЫХ ИЗОТИОМОЧЕВИНЫ

Андреева Е.П., Прошин А.Н., Серков И.В.

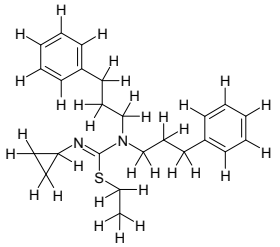
Институт Физиологически Активных Веществ РАН, Черноголовка, Россия
e-mail: proshin@ipac.ac.ru

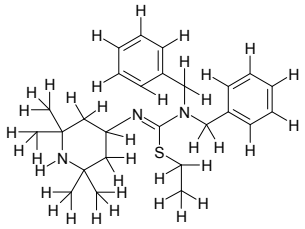
Методы QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships) и QSPR (Quantitative Structure Property Relationships) в настоящее время являются наиболее интенсивно развивающимися вычислительными методами для изучения взаимосвязи структура-активность/свойство в химии, биологии, медицине, экологии и связанных с ними областях науки. Они широко используются для анализа и предсказания химических свойств и биологической активности органических соединений на основе структуры молекулы. Одним из методов QSAR является кластеризация исходной базы данных, в результате которой исследователь получает возможность изучения химической или биологической активности в рядах близкородственных соединений [1].

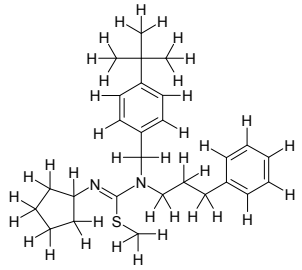


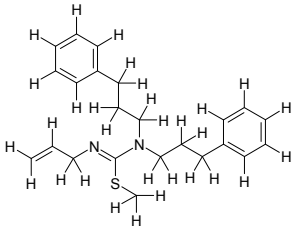
Нами проведены исследования ряда производных изотиомочевины (78 соединений), а именно S,N,N,N'-тетразамещенных изотиомочевин, являющихся блокаторами глутамат-индуцированного захвата Ca^{2+} [2]. В последнее время большой интерес в качестве перспективных лекарственных препаратов привлекают к себе молекулы, содержащие фармакофорный изотиурониевый фрагмент и обладающие интересными фармакологическими, в том числе и нейропротекторными свойствами [3]. S,N,N,N'-Тетразамещенные изотиомочевины были синтезированы реакцией оригинальных тиомочевин с алкилгалогенидами [4].

В качестве дескрипторов (описателей) молекулярной структуры были взяты топологические индексы (87 дескрипторов) [5], которые количественно описывают молекулярную топологию. Представление молекулы в виде набора дескрипторов позволяет рассматривать ее в виде точки в n – мерном пространстве, а близость точек в таком пространстве использовать в качестве критерия схожести молекул и их биологической активности. Дескрипторы, имеющие нулевую вариацию, и сильно закоррелированные дескрипторы были удалены из рассмотрения, а к оставшимся применен метод главных компонент, что позволило сократить размерность пространства до 4-х. В полученном таким образом 4-х мерном пространстве факторов была проведена кластеризация [6]. В результате были выделены 18 кластеров. Соединения, принадлежащие отдельным кластерам, имеют схожую молекулярную структуру, что в дальнейшем позволяет сделать анализ зависимости их биологической активности от фрагментов, входящих в молекулярную структуру. Ниже приведены соединения, входящие в разные кластеры.









Работа выполнена при финансовой поддержке госконтракта по ФЦП № 14.740.11.0810, гранта по Программе Президиума РАН № 7, гранта РФФИ № 11-03-00863-а.

Литература:

1. *G. Downs, J.Barnard, V.* 18, ed. Lipkowitz K. and Boyd D, Wiley-VCH, 2002, P.1–40.
2. *S. Bachurin, A. Proshin et al. Drug Fut.,* 2004, V. 29, Supp.A., P. 188.
3. *G.L. Perlovich, A.N. Proshin et al. J.* Med. Chem., 2009, V. 2, № 7, P.1845–1852.
4. *Tkachenko S.E., Proshin A.N. et al.* Russian patent № 2223952.
5. *Todeschini R., Consonni V.,* Handbook of Molecular Descriptors, Wiley-VCH Publishers, Weinheim, 2000.

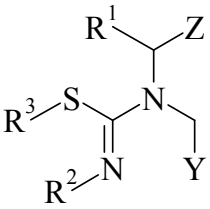
APPLICATION QSAR AND QSPR METHODS FOR ANALYSIS OF "STRUCTURE–ACTIVITY" DEPENDENCE FOR DERIVATIVES OF ISOTHIOUREA

Andreeva E.P., Proshin A.N., Serkov I.V.

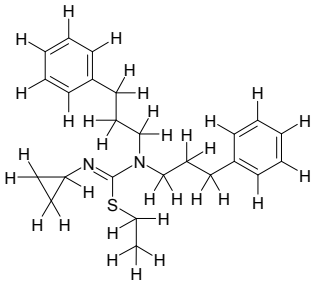
Institute of Physiologically Active Compounds RAS, Chernogolovka, Russia
e-mail: proshin@ipac.ac.ru

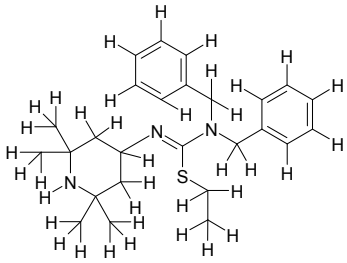
Quantitative structure activity relationships (QSAR) and quantitative structure property relationships (QSPR) are one of well known methods in chemistry, biology, biochemistry, toxicology, medicine and related fields. It is used for prediction various chemical properties or biological activities of compounds by their structures. Clustering of a source database is a one of QSAR methods. It is used for rearranging observed data in order to study chemical or biological activity for similar series of compounds [1].

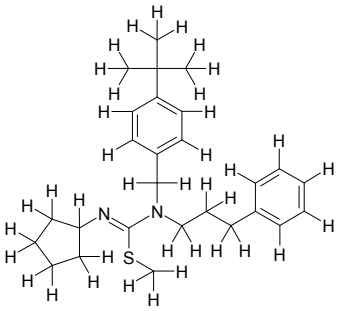
We are investigated some derivatives of the isothiourea (78 compounds), namely S,N,N,N'-tetrasubstituted isothiourea which have an influence on glutamate-induced $^{45}Ca^{2+}$ uptake into synaptosomes of the rat brain [2]. Compounds containing pharmacophoric isothiourea fragment have a large interest as perspective medicine with neuroprotective properties [3]. S,N,N,N'-tetrasubstituted isothioureas have been synthesized by reaction original thioureas with alkylhalids [4].

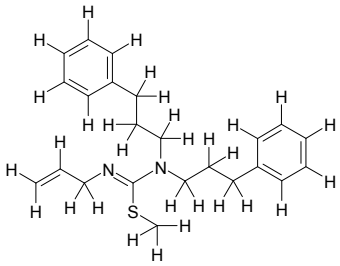


Topological decriptors (87 items) were taken as specifiers of molecular structure [5]. They are numerical quantifiers of molecular topology. Numerical representation of chemical structure as a set of descriptors gives an opportunity to consider it as a point in n-dimensional space and proximity of points in multidimensional descriptor space as criteria of molecular similarity and their biological activity. Descriptors which have zero variance and strongly correlated descriptors were eliminated from examination. To reduce the number of variables a principal component analysis (PCA) applies to set of rest descriptors. The 4-dimensional factor space was obtained in which cluster analysis was carried out [6]. In result 18 clusters were extracted. Compounds belonging to individual cluster have similar structures that allows in further make their biologic activity prediction on the base of similar structural fragments in molecules. Compounds belonging to different clusters are presented below.









The investigation was supported by the State contract № 14.740.11.0810, the grant of the RFBR № 11-03-00863-a.

References:
1. *G. Downs, J.Barnard, V.* 18, ed. Lipkowitz K. and Boyd D, Wiley-VCH, 2002, P.1–40.
2. *S. Bachurin, A. Proshin et al. Drug Fut.,* 2004, V. 29, Supp.A., P. 188.
3. *G.L. Perlovich, A.N. Proshin et al.* J. Med. Chem., 2009, V. 2, № 7, P.1845–1852.
4. *Tkachenko S.E., Proshin A.N. et al.* Russian patent № 2223952.
5. *Todeschini R., Consonni V.,* Handbook of Molecular Descriptors, Wiley-VCH Publishers, Weinheim, 2000.

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ФОЛАТСОДЕРЖАЩИХ ПОЛИУРЕТАНМОЧЕВИН

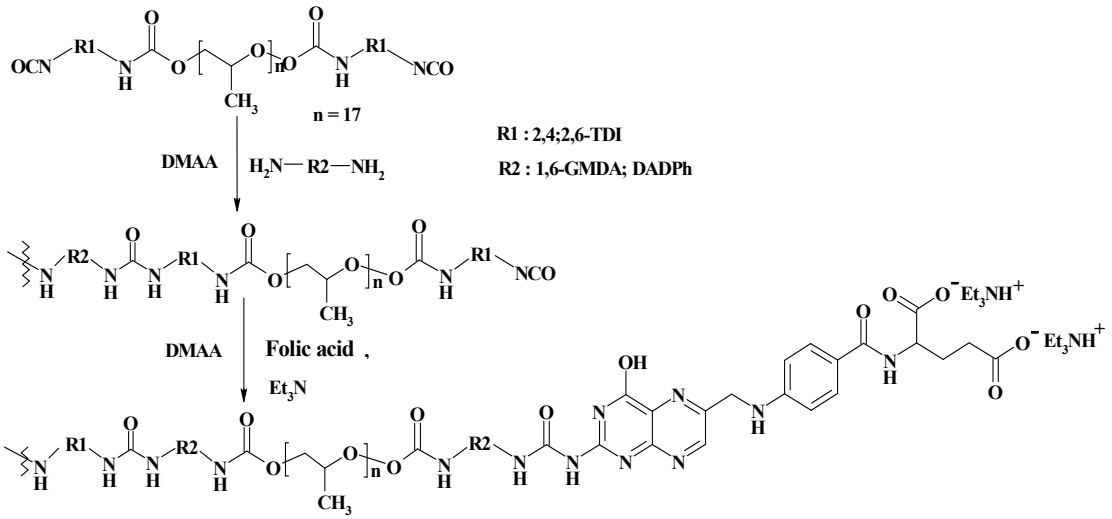
Андрюшина Е.С., Рожнова Р.А., Галатенко Н.А., Закашун Т.Е., Киселева Т.А.

Институт химии высокомолекулярных соединений НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: politoks@merlin.net.ua

На сегодняшний день актуальными являются исследования, связанные с созданием новых биологически активных полиуретанмочевин, которые содержат фолиевую кислоту, как пленочные покрытия для ран и ожогов, способных стимулировать регенераторные процессы.

Фолиевая кислота (ФК, N-птероил-L-глутаминовая кислота) известна как витамин способный стимулировать регенераторные процессы. Поскольку ФК в организме превращается в тетрагидрофолевую кислоту за счет присоединения атомов водорода к атомам углерода и азота в положениях С-6, С-7 и N-5, N-8, которая выполняет биохимическую функцию кофермента в межмолекулярном транспорте одноуглеродных групп различной степени окисления и принимает участие в синтезе РНК и ДНК [1], введение ФК в состав полимерного носителя позволит получить материал с собственной биологической активностью, способный стимулировать регенераторные процессы.

С целью создания биологически активного материала с вышесказанными свойствами был синтезирован ряд полиуретанмочевин (ПУМ) на основе макродиизоцианата (МДИ), диаминов (ДА) (1,6-гексаметилендиамин (ГМДА), 4,4'-диаминодифенилметан (ДАДФ)) и фолиевой кислоти при различном мольном соотношении ДА:ФК как 1:1, 3:1, 10:1 соответственно. Возможность химической иммобилизации ФК на полиуретане была изучена на примере модельной реакции с фенилизоцианатом. Проведенные исследования (ЯМР-, ИК-спектроскопия) показали, что иммобилизация фолиевой кислоты на полиуретановом носителе происходит как химически с образованием мочевинных связей, так и за счет водородных взаимодействий [2].



Были изучены структура и свойства синтезированных полиуретанмочевин. Учитывая дальнейшую область использования ПУМ как покрытий для лечения ран и ожогов, кроме физико-химических и физико-механических испытаний нами были проведены исследования динамики выхода лекарственного перпарата в условиях in vivo. Как показали исследования, для всех образцов характерно постепенное высвобождение ФК. Суммарное количество пысвобожденного препарата составляло 34,8 – 88,3 % от общего количества в системе.

Для изучения эффективности пролонгированной формы фолиевой кислоты была разработана модель интоксикации печени у подопытных животных путем их алкоголизации. Известно, что алкогольная интоксикация печени приводит к повышению в крови уровня глутаматдегидрогеназы. Фолиевая кислота являясь коферментом для глутаматдегидрогеназы в составе полимерного носителя поступая пролонгировано в кровь подопытных животных приводила к нормализации уровня этого фермента в крови к 1 месяцу исследования.

Литература:

1.*Губський Ю. І.* Біологічна хімія / Губський Ю. І. – Київ – Вінниця: НОВА КНИГА, 2009. – 664 с.
2.*Андрюшина Е.С., Рожнова Р.А., Галатенко Н.А., Киселева Т.А.* // Полимерный журнал. - 2010. – Т. 32, № 1. – С. 84-88.

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF NEW BIOLOGICALLY ACTIVE FOLAT-CONTAINING POLYURETHANE UREAS

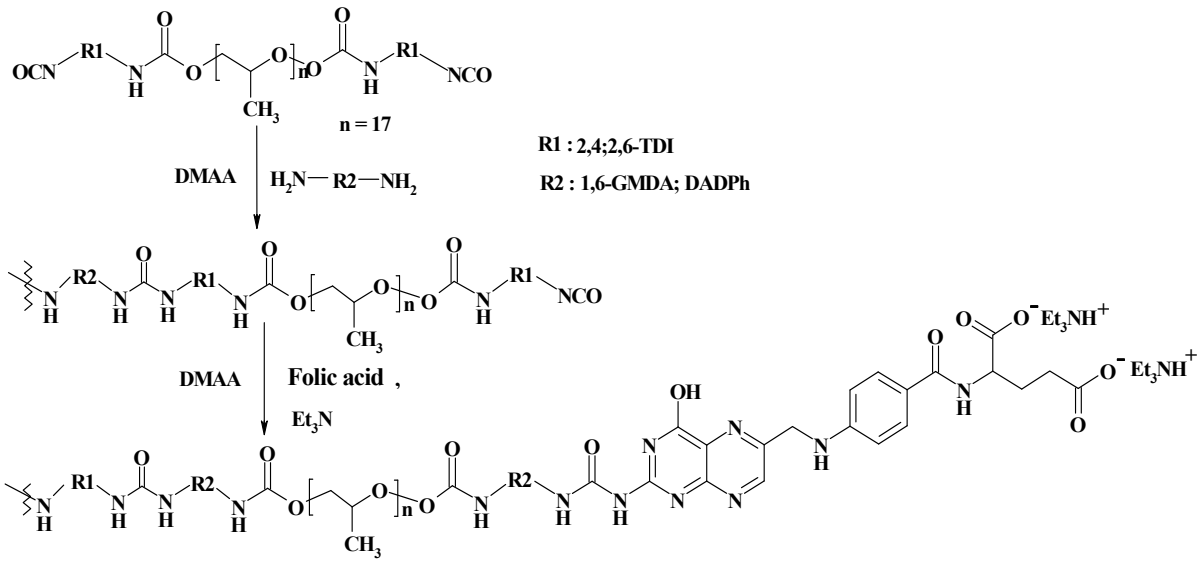
Andrjushina Ye.S., Rozhnova R. A., Galatenko N.A., Zakashun T.Ye., Kiseleva T.A.

Institute of macromolecular chemistry NASc of Ukraine, Kiev
e-mail: politoks@merlin.net.ua

For today the researches connected with creation new biologically active polyurethane ureas that contain folic acid as film coverings for wounds and the burns, capable to stimulate regeneration processes are actually.

Folic acid (FA, N-pteroil-L-glutamic acid) is known as vitamin capable to stimulate regeneration processes. As FA in an organism turns in tetra hydrofolic acid at the expense of joining of atoms of hydrogen to atoms of carbon and nitrogen in positions C-6, C-7 and N-5, N-8 that carries out biochemical function of a coenzyme in intermolecular transport of one-carbon groups of various degree of oxidation and takes part in synthesis RNA and DNA [1], introduction FA in structure of the polymeric carrier will allow to receive a material with own biological activity, capable to stimulate regeneration processes.

For the purpose of creation of biologically active material with above mentioned properties a number polyurethane ureas (PUMAS) on a basis macrodiisocyanate (MDI), diamines (DA) (1,6-hexamethylenediamine (GMDA), 4,4'-diaminediphenylmethane (DADPh)) and folic acid has been synthesized at various mole ration DA:FA as 1:1, 3:1, 10:1 accordingly. Possibility of chemical immobilization FA on polyurethane has been studied on an example of modeling reaction with phenyl isocyanate. The conducted researches (NMR-, IR-spectroscopy) have shown that the immobilization of folic acid on polyurethane carrier occurs as chemically to formation urea's linkage, and at the expense of hydrogen interactions [2].



Have been studied structure and properties synthesized PUMAS. Considering the further area of use of PUMAS as coverings for treatment of wounds and burns, except physical and chemical and physical-mechanical tests we had been conducted researches of drug release of the medicinal in conditions in vivo. As have shown researches, for all samples gradual release FA is characteristic. The total quantity of released medicinal are 34,8 – 88,3 % from total in system.

The model of an intoxication of a liver has been developed for studying of efficiency of the prolonged form of folic acid at experimental animals by them alcoholization. It is known that the alcoholic intoxication of a liver leads to increase in level blood of glutamate dehydrogenase. Folic acid being a coenzyme for glutamate dehydrogenase as a part of the polymeric carrier arriving it is prolonged in blood of experimental animals led to normalization of level of this enzyme in blood by 1 month of research.

References:

1. *Gubsky Yu.I.* Biological Chemistry / Gubsky Yu. I. – Kiev – Vinnitca: The NEW BOOK, 2009. – 664 p.
2. *Andrjushina E.S., Rozhnova R. A, Galatenko N.A., Kiseleva T.A.* // Polymeric J. - 2010. – Vol. 32, № 1. – P. 84-88.

ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ МЕЧЕННЫХ ТРИТИЕМ ПРОИЗВОДНЫХ ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

[1] Бадун Г.А., [1] Чернышева М.Г., [1]Тясто З.А., [2] Гуринович В.А., [2]Катковская И.Н., [2] Мойсеенок А.Г.

[1]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
e-mail: badunga@yandex.ru
[2]ГУ «НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Гродненский филиал, Беларусь
e-mail: val@biochem.unibel.by

Использование тритиевой метки наряду с современными аналитическими методами позволяет непосредственно контролировать количество изучаемых веществ в органах и тканях, а также проследить пути их метаболизма. Для установления роли пантотеновой кислоты и продуктов ее метаболизма при развитии различных нейродегенеративных патологий удобно использовать меченные тритием соединения поскольку способы идентификации витамина и его производных чрезвычайно ограничены. Для введения радиоактивной метки в указанные выше вещества использовали метод термической активации трития. Специфика метода такова, что потоком атомов трития обрабатывается твердая мишень органического соединения. В результате происходит замещение водорода на тритий во всех доступных положениях молекулы. Учитывая то обстоятельство, что атомарный тритий способен модифицировать исходное соединение за счет побочных реакций, то всегда требуется провести выбор условий проведения эксперимента, когда образование меченых побочных продуктов минимизировано. Именно на примере природного соединения пантотеновой кислоты – пантетина было показано, что метод термической активации можно успешно использовать для введения радиоактивной метки в соединения, легко подвергаемые модификации (восстановление связи S-S) [1]. Дальнейшие исследования показали применимость этого подхода к другим классам соединений [2]. Традиционный вариант метода термической активации трития использует охлаждение мишени до 77 К, что обеспечивало устойчивость промежуточных радикалов, образующихся в процессе введения трития в органические молекулы. В последние годы были предприняты попытки повысить эффективность введения радиоактивной метки путем повышения температуры мишени. Было показано, что использование такого подхода для ряда биологически активных веществ позволило увеличить удельную радиоактивность меченого материнского соединения в 2-10 раз [3]. В докладе рассматриваются конкретные примеры получения меченных тритием пантенола, пантотеновой кислоты, 4-фосфопантотеновой кислоты, пантетина, а также гомопантотеновой кислоты с помощью метода термической активации трития. Показано, что удается достичь удельной радиоактивности до 1 ТБк/ммоль с высоким радиохимическим выходом меченого соединения.

С использованием способов интрацеребровентрикулярного и внутрибрюшинного введения [^{3}H]-пантотената натрия, пантетина и пантенола с исследованием динамики их захвата, накопления и биотрансформации в структурах мозга белых крыс установлено преимущественно экстрацеребральное происхождение доминирующего метаболита производных пантотеновой кислоты в гиппокампе и других структурах мозга - 4'-фосфопантотеновой кислоты (ФПК) и установлены принципиальные различия его транспорта через сосудистое сплетение мозга и капилляры гемато-энцефалического барьера [4]. Выявлено, что гиппокамп характеризуется высоким уровнем накопления меченых предшественников CoA. Роль ФПК в ЦНС, вероятно не исчерпывается участием в процессе биосинтеза CoA, но связывается с регуляцией свободной формы цистеина, проявляющего экзайтотоксичность. С точки зрения биодоступности и стабилизации нейронального фонда ФПК, например, в гиппокампе, применение пантетина и, в меньшей мере, пантенола является предпочтительным. Возможность использования препарата ФПК проверена в эксперименте с интрацеребровентрикулярным введением, в котором получен высокий и устойчивый уровень дефосфорилирования со слабой биотрансформацией в 4'-фосфопантетеин [5]. Эксперименты с [^{3}H]-гомопантотенатом впервые выявили значительную степень фосфорилирования соединения.

Полученные результаты открывают возможность целенаправленного применения производных пантотеновой кислоты для профилактики и коррекции нейродегенеративной патологии, сопровождающейся нарушением фосфорилирования пантотената и биосинтеза CoA.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект №09-03-00819), Российской Федеральной целевой программы «Научные и педагогические кадры инновационной России 2009 – 2013 гг» (ГК № П2351) и гранта БРФФИ-РФФИ (проект № Б10Р-135).

Литература:

1. *Г.А. Бадун, Э.С. Филатов.* О возможности получения ^{3}H-пантетина методом термической активации трития // Радиохимия. 1991. Т. 33, № 1. С. 75-77
2. *Г.А. Бадун.* Метод термической активации как универсальный способ получения меченых соединений // Биохимия, фармакология и клиническое применение пантотеновой кислоты (под ред. чл.-корр. НАН Беларуси А.Г. Мойсеенка) Сборник научных статей. Гродно, 2003. С. 9-14
3. *G.A. Badun, M.G. Chernysheva.* How to increase labeling efficiency by tritium thermal activation method? // Abstracts of the VIII Finnish-Russian Symposium on Radiochemistry. 4-5 September 2009, Turku, Finland. P. 96-97
4. *А.Г. Мойсеенок, И.Н. Катковская, В.А. Гуринович, А.А. Денисов, С.Г. Пашкевич, В.А. Кульчицкий.* Поглощение и биотрансформация предшественника биосинтеза кофермента А D-пантетина в гиппокампе белых крыс // Нейрохимия. 2010. Т. 27, № 4. С. 286-293
5. *А.Г. Мойсеенок, В.А. Гуринович, И.Н. Катковская, Г.А. Бадун, Н.В. Гуляева.* Биотрансформация предшественников биосинтеза кофермента А в структурах мозга // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2008. № 4. С. 48-54

PRODUCTION AND APPLICATION OF TRITIUM-LABELED PANTOTHENIC ACID DERIVATIVES

[1]Badun G.A., [1]Chernysheva M.G., [1]Tyasto Z.A., [2]Gurinovich V.A., [2]Katkovskaya I.N., [2]Moiseenok A.G.

[1]M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
e-mail: badunga@yandex.ru
[2]Institute of Pharmacology and Biochemistry, National Academy of Sciences, Grodno, Belarus
e-mail: val@biochem.unibel.by

Application of tritium label in combination with current analytical methods allows to control the amount of organ and tissue substances directly as well as to follow their metabolic pathways. It is convenient to use tritium-labeled compounds to determine the role of pantothenic acid and its metabolic products during development of various neurodegenerative pathologies. The method of tritium thermal activation was used for introduction of the radioactive label into the above substances. The essence of the matter is in treating a solid target of an organic compound with a flow of tritium atoms. As a result, hydrogen is substituted for tritium in all the accessible positions of the molecule. Taking into consideration the ability of atomic tritium to modify the initial compound due to side reactions, it is always required to select experimental conditions of minimized formation of labeled byproduct. It was the example of pantethine that showed that the method of chemical activation could be successfully used for introduction of the radioactive label into readily modifiable compounds (recovery of the S-S bond) [1]. Further studies showed applicability of this approach to other class of compounds [2]. The traditional variant of the tritium thermal activation method used cooling of the target to 77 K, which provided stability of intermediate radicals formed during tritium introduction into organic molecules. In recent years, attempts have been made to enhance the efficiency of radioactive label introduction by increasing the temperature of the target. It was shown that using this method for some biologically active substances allowed to increase the specific radioactivity of the labeled mother compound by 2-10 times [3]. The paper shows examples of production of tritium-labeled panthenol, pantothenic acid, 4-phosphopantothenic acid, pantethine, as well as homopantothenic acid by the use of tritium thermal activation. It was shown that specific radioactivity can reach 1 TBq /mmol with a high radiochemical yield of the labeled compound.

The methods of intracerebroventricular and intraperitoneal administration of [^{3}H]-sodium pantothenate, pantethine and panthenol along with on the dynamics of their uptake, accumulation and biotransformation in albino rat brain structures were used to find a primarily extracerebral origin of the dominant pantothenic acid derivative metabolite, 4'-phosphopantothenic acid (PPa), in the hippocampus and other brain structures and principal differences were established in its transport across the vascular plexus and capillaries in the blood-brain barrier [4]. It was found that the hippocampus was characterized by a high level of labeled CoA precursors accumulation. The role of PPa in the CNS may not be limited to participation in CoA biosynthesis but is related to regulation of the free form of cysteine which manifests its excitotoxicity. On the basis of bioavailability and stabilization of the PPa pool, e.g., in the hippocampus, the application of pantethine and, to a less extent, of panthenol is preferable. The possibility of the application of the PPa preparation was tested in the experiment with intracerebroventricular administration where high and stable dephosphorylation level with weak biotransformation to 4'-phosphopantetheine was obtained [5]. The experiments with [^{3}H]-homopantothenate were the first to show a considerable extent of this compound phosphorylation.

The work was supported by the RFFR grant (Project No 09-03-00819) of the Russian Federal target program "Scientific and Pedagogical Personnel of Innovative Russia in the years 2009-2013" (GK No P2351) and BFFR and RFFR (project No B10R-135).

References:

1. *G.A. Badun, E.S. Filatov.* On the possibility of ^{3}H-pantethine production by the method of tritium thermal activation // Radiochemistry.1991. Vol. 33. No. 1. P.75-77
2. *G.A. Badun.* Tritium thermal activation as a universal method to obtain labelled compounds // In: Biochemistry, pharmacology, and clinical use of pantothenic acid derivatives. Proc. Int. Symposium (Ed. A.G. Moiseenok). Grodno, 2003. P. 9–14
3. *G.A. Badun, M.G. Chernysheva.* How to increase labeling efficiency by tritium thermal activation method? // Abstracts of the VIII Finnish-Russian Symposium on Radiochemistry. 4-5 September 2009, Turku, Finland. P. 96-97
4. *A.G. Moiseenok, I.N. Katkovskaya, V.A. Gurinovich, A.A. Denisov, S.G. Pashkevich, V.A. Kul'chitskii.* Absorption and biotransformation of the coenzyme A precursor D-pantethine in rat hippocampus // Neurochemical Journal. 2010. Vol. 4. No.4. P. 257-264
5. *A.G. Moiseenok, V.A. Gurinovich, I.N. Katkovskaya, G.A. Badun, N.V. Gulyaeva.* Biotransformation of precursors of coenzyme A biosynthesis in brain structures // Vestsi NAN Belarusi. Ser. Med. Navuk. 2008. No. 4. P. 48-54

МЕЧЕННЫЕ ТРИТИЕМ СОЕДИНЕНИЯ КАК ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ СВОЙСТВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Бадун Г.А., Чернышева М.Г.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
e-mail: badunga@yandex.ru

Эффективным инструментом в исследовании поведения биологически активных веществ в живых организмах и их взаимодействия с клетками могут быть соединения, меченные радионуклидами. Тритий имеет ряд преимуществ по сравнению с другими радионуклидами в этих исследованиях. Период полураспада у трития 12,3 года, что позволяет получать меченые соединения с высокой удельной радиоактивностью, но в то же время проводить исследования достаточно долгое время. К тому же работа с меченными тритием соединениями достаточно безопасна из-за низкой энергии бета-излучения этого радионуклида. Метод термической активации трития занимает важное место в ряду методов введения радиоактивной метки в органические вещества [1]. Изменяя условия проведения эксперимента (температура, давление газа, продолжительность экспозиции и др.) можно ввести радиоактивную метку практически в любое органическое вещество: от аминокислот и низкомолекулярных поверхностно-активных веществ до биополимеров, включая белки и гуминовые вещества; а также достичь высоких значений удельной радиоактивности меченого продукта. Полученные с помощью метода термической активации меченые биологически активные вещества находят широкое использование в химических и биохимических научных исследованиях. Здесь мы перечислим лишь некоторые: модификация поверхностей [2,3]; взаимодействие биологически-активных полимеров с мембранами раковых [4,5] и бактериальных клеток, с растениями [6,7]; процессы метаболизма и биосинтеза в организме [8,9]; разработка новых лекарственных средств [10] и способов их введения [11,12].

В докладе рассматриваются принципы получения меченных тритием соединений с помощью метода термической активации, характерные примеры получения меченых биологически активных веществ и использования в химических и биохимических исследованиях. Особое внимание уделяется исследованию с помощью тритиевой метки взаимодействия меченных тритием биологически активных соединений с наноматериалами. В последние годы достигнут значительный прогресс в исследовании поверхностно активных свойств и гидрофобности биологически активных веществ с помощью специального варианта применения жидкостной сцинтилляционной спектрометрии, в котором рассматривается распределение меченного тритием вещества между водным раствором и органической жидкостью (метод сцинтиллирующей фазы) [13,14]. Такая система может выступать как простейшая модель взаимодействия биологически активных веществ с мембраной клеток. Данный подход может быть использован как для индивидуальных веществ, так и для смесей веществ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 09-03-00819) и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (ГК П2351).

Литература:

1. *А.В. Шишков, Э.С. Филатов и др.* // Получение меченных тритием биологически активных веществ. – Докл. АН СССР, 1976, Т. 228, С. 1237-1239
2. *M.G. Chernysheva, G.A. Badun.* // Radiochemical study of biopolymers sorption on hydrophobic surfaces. - Chemistry, Physics and Technology of Surface, 2010, V. 1, N 3, P. 355–359
3. *O.A. Soboleva, G.A. Badun, A.A.Yaroslavtsev.* // New technique based on the use of tritium labeled compounds for studying the adsorption of surfactant mixtures. – Mend. Comm., 2004, N 1, P. 20-21
4. *N.S. Melik-Nubarov, O.O. Pomaz, T.Y. Dorodnych et al.* // Interaction of tumor and normal blood cells with ethylene oxide and propylene oxide block copolymers. - FEBS Lett., 1999. V.446. N.1, P.194-198
5. *A. E. Zhirnov, D. N. Pavlov et al.* // Effect of the structure of ethylene oxide-propylene oxide block copolymers on their interaction with biological membranes. - Polymer Science Series A, V. 48, N 11, P. 1202-1210
6. *G.A. Badun, N.A. Kulikova, M.G. Chernysheva et al.* // Tritium Labeling: A Unique Tool for Studying the Behavior of Humic Substances in Living Systems. - Moscow University Chemistry Bulletin 2009, Vol. 64, N 5, P. 276–281
7. *N.A. Kulikova, I.V. Perminova, G.A. Badun, M.G. Chernysheva, O.V. Koroleva, E.A. Tsvetkova* //Estimation of uptake of humic substances from different sources by Escherichia coli cells under optimum and salt stress conditions by use of tritium-labeled humic materials. – Appl. Environmental Microbiol., V. 76, N 18, P. 6223–6230
8. *В.А. Гуринович и др.* // Распределение и биотрансформация [^{3}H]-D-пантенола в отделах головного мозга в норме и при моделировании алюминиевого нейротоксикоза. – Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. 2006, №2, С. 66-71
9. *A. G. Moiseenok, V. A. Gurinovich et al.* // Synthesis of 4'-[^{3}H]-Phospho-Pantothenic Acid and Studies of Its Metabolism in Structures of the Brain. - Neurochemical Journal, V. 1, N 4, P. 299-304
10. *Г.А. Бадун, А.П. Будько, З.Г. Дейчман, Е.Ю. Колесникова, М.Г. Чернышева* // Цифетрелин – синтез меченого препарата и подходы к изучению фармакокинетики. - Российский биотерапевтический журнал, 2010, Т.9, N 2, С. 63-64
11. *Е.Г. Рыбакова, С.Э. Аветисов, Г.А. Бадун, А.В. Краснянский* // Закономерности десорбции лекарственных препаратов из мягких контактных линз. Сообщение 2. Исследование *in vivo*. - Вестник офтальмологии. 1996. N 1. С. 18-20
12. *Е.В. Диденко, Ю.Е. Батманов, Г.А. Бадун, З.А. Тясто, М.Г. Чернышева* // Сорбция и десорбция лекарственных препаратов в силикон-гидрогелевых контактных линзах. – Офтальмология, 2010, Т. 7, № 3, С. 54-59
13. *M.G. Chernysheva, Z.A. Tyasto, G.A. Badun* // Scintillation phase method: A new approach for studying surfactant behavior at liquid/liquid interface. - J. Radioanalytical and Nuclear Chemistry. 2009. V. 280, N.2 P. 303–306
14. *M.G. Chernysheva, G.A. Badun* // Liquid scintillation spectrometry of tritium in studying lysozyme behavior in aqueous/organic liquid systems. The influence of the organic phase.- Langmuir. 2011, V. 27 N 6, P. 2188-2194

TRITIUM LABELED COMPOUNDS AS AN APPROACH IN STUDYING PROPERTIES OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES

Badun G.A., Chernysheva M.G.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
e-mail: badunga@yandex.ru

Radio-labeled compounds are widely used in studying biological activity of substances, their biodistribution and interactions with cells. In this field tritium has several advantages in comparing with other radionuclides. Half life of tritium is 12,4 y that provides high specific radioactivity of labeled compound but at the same time it is rather long for the experimental study. Furthermore it is safety to work with tritium-labeled compounds because of low energy of β-radiation of the isotope. Tritium thermal activation method plays an important role among the techniques of tritium labeling of organic substances [1]. Variations in the labeling conditions (temperature, gas pressure, exposure time and etc.) result in rather high specific radioactivity labeled product and universality in the applicability of the technique. Indeed, the method allowed to introduce tritium in the wide range of organic compounds from amino acids and low-molecular weight surfactants to biopolymers including proteins and humic substances. [^{3}H]-substances produced by tritium thermal activation method are widely used in chemical and biochemical researches. Here we just listed some of them: the surface modification [2,3]; the interaction of biological active polymers with the membrane of cancer cells [4,5], bacterial cells and plants [6,7]; the process of metabolism and biosynthesis in the organism [8,9]; drug designing [10] and novel mechanisms of drug injections [11,12].

In this presentation we are going to discuss the main principals of obtaining [^{3}H]-compounds by tritium thermal activation method, focused on the biological active compounds and the details of their application in chemical and biochemical researches. The investigation of the interaction of biological active compounds with nanomaterials will be specially emphasis because of its critical importance in the present and future. Studying surface activities and hydrophobicity of biological active substances by special type of liquid scintillation spectrometry has significant progress in last several years. This technique allowed to follow the adsorption and distribution of [^{3}H]-compound in the system of two immiscible liquids (scintillation phase method) [13,14]. Such systems are usually considered as a model of the interaction of biological active compound with cellular membrane. This approach is used not only for individual compounds but also for multy-compounent mixtures.

This work was supported by the Russian Foundation of Basic Research (Grant # 09-03-00819) and by the Federal Targeted Program, "Scientific and scientific-pedagogical personnel of innovation Russia" from 2009 to 2013 (Project # 2351P).

References

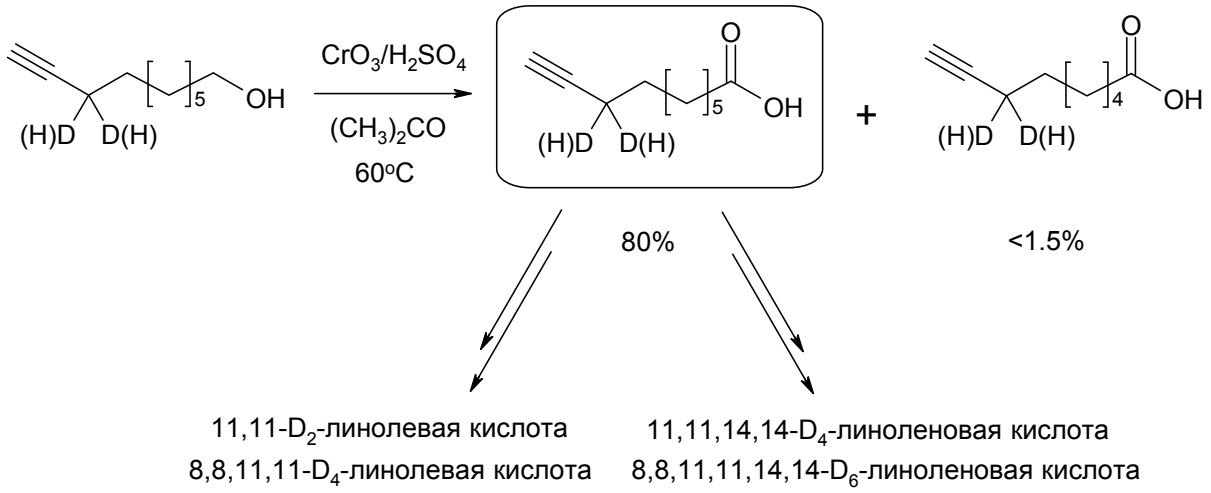
1. *A.V. Shishkov, E.S. Filatov et al.* // Obtaining of tritium labeled biological active substances. - Dokl. Acad. Sci. USSR, 1976, V. 228, P. 1237-1239 (*in Russian*)
2. *M.G. Chernysheva, G.A. Badun* // Radiochemical study of biopolymers sorption on hydrophobic surfaces. - Chemistry, Physics and Technology of Surface, 2010, V. 1, N 3, P. 355–359
3. *O.A. Soboleva, G.A. Badun, A.A.Yaroslavtsev* // New technique based on the use of tritium labeled compounds for studying the adsorption of surfactant mixtures. – Mend. Comm., 2004, N 1, P. 20-21
4. *N.S. Melik-Nubarov, O.O. Pomaz, T.Y. Dorodnych et al.* // Interaction of tumor and normal blood cells with ethylene oxide and propylene oxide block copolymers. - FEBS Lett., 1999. V.446. N.1, P.194-198
5. *A. E. Zhirnov, D. N. Pavlov et al.* // Effect of the structure of ethylene oxide-propylene oxide block copolymers on their interaction with biological membranes. - Polymer Science Series A, V. 48, N 11, P. 1202-1210
6. *G.A. Badun, N.A. Kulikova, M.G. Chernysheva et al.* // Tritium Labeling: A Unique Tool for Studying the Behavior of Humic Substances in Living Systems. - Moscow University Chemistry Bulletin 2009, Vol. 64, N 5, P. 276–281
7. *N.A. Kulikova, I.V. Perminova, G.A. Badun, M.G. Chernysheva, O.V. Koroleva, E.A. Tsvetkova* //Estimation of Uptake of Humic Substances from Different Sources by Escherichia coli Cells under Optimum and Salt Stress Conditions by Use of Tritium-Labeled Humic Materials. - Applied Environmental Microbiology, V. 76, N 18, P. 6223–6230
8. *V. A. Gurinovich, I.N. Evkovich et al.* // [^{3}H]-D- Panthenol distribution and biotransformation in the brain regions both in normal state and in simulatiing aluminum neurotoxicosis. - Vestsi NAN Belarusi. Ser. Med. Navuk. 2006. № 2. P. 66–71 (*in Russian*)
9. *A. G. Moiseenok, V. A. Gurinovich et al.* // Synthesis of 4'-[^{3}H]-phospho-pantothenic acid and studies of its metabolism in structures of the brain. - Neurochemical Journal, V. 1, N 4, P. 299-304
10. *G.A. Badun, A.P. Budko et al.* // Cyphetreline – synthesis of labeled preparation and approaches to pharmacokinetics investigation. – Russian biotherapeutic journal. 2010, V.9, N 2, P. 63-64 (*in Russian*)
11. *E.G. Rybakova, S.E. Avetisov, G.A. Badun, A.V.Krasnianskii* // Regularities of drug desorption from soft contact lenses. 2. *in vivo* study. – Vestn. Oftalmol. 1996, V. 112, N 1, P. 18-20 (*in Russian*)
12. *E.V. Didenko, Y.E. Batmanov, G.A. Badun, Z.A. Tyasto, M.G. Chernysheva* // Sorption and desorption of drugs in silicon-hydrogelic lenses. – Ophthalmology. 2010, V. 7, N 3, P. 54-59 (*in Russian*)
13. *M.G. Chernysheva, Z.A. Tyasto, G.A. Badun* // Scintillation phase method: A new approach for studying surfactant behavior at liquid/liquid interface. - J. Radioanalytical and Nuclear Chemistry. 2009. V. 280, N.2 P. 303–306
14. *M.G. Chernysheva, G.A. Badun* // Liquid scintillation spectrometry of tritium in studying lysozyme behavior in aqueous/organic liquid systems. The influence of the organic phase. - Langmuir. 2011, V. 27 N 6, P. 2188-2194.

ИЗУЧЕНИЕ ДЕГРАДАЦИИ УГЛЕРОДНОГО СКЕЛЕТА ПРИ ОКИСЛЕНИИ ПЕРВИЧНЫХ СПИРТОВ В СИНТЕЗЕ ДЕЙТЕРИРОВАННЫХ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

[1]Бекиш А.В., [2]Лысенко И.Л., [2]Мартыненко Ю.В., [2]Кузмитович Е. А.

[1]Белорусский Государственный Университет, Минск, Беларусь
e-mail: andreibekish@yahoo.com
[2]Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Полиненасыщенные жирные кислоты играют важную роль в физиологии и биохимии организмов. Предлагаемый подход к синтезу дейтерированных полиненасыщенные жирных кислот включает использование децин-9-овой кислоты (в том числе содержащей атомы дейтерия в пропаргильном положении) [1]. В процессе получения последней путем окисления соответствующего первичного спирта нами было замечено образование трудноотделимой примеси нонин-8-овой кислоты. Так, в классическом окислении по Джонсу (0^oC, хромовая кислота в ацетоне) ее относительное количество превышало 6%. Согласно проведенным исследованиям, деградация углеродного скелета в процессе окисления первичных спиртов до соответствующих карбоновых кислот является общей побочной реакцией, наряду с известной реакцией образования сложных эфиров. Например, при окислении деканола-1 азотной кислотой в смеси образующихся кислот содержание нонановой кислоты составляет 37%. Нами проведена оптимизация синтеза децин-9-овой кислоты (и ее 8,8-дидейтерированного производного) для уменьшения содержания продукта деградации с использованием различных окислительных систем.



Полученные соединения были использованы для синтеза дейтерированных аналогов линолевой и линоленовой кислот с достаточной для биологических испытаний чистотой.

Литература:

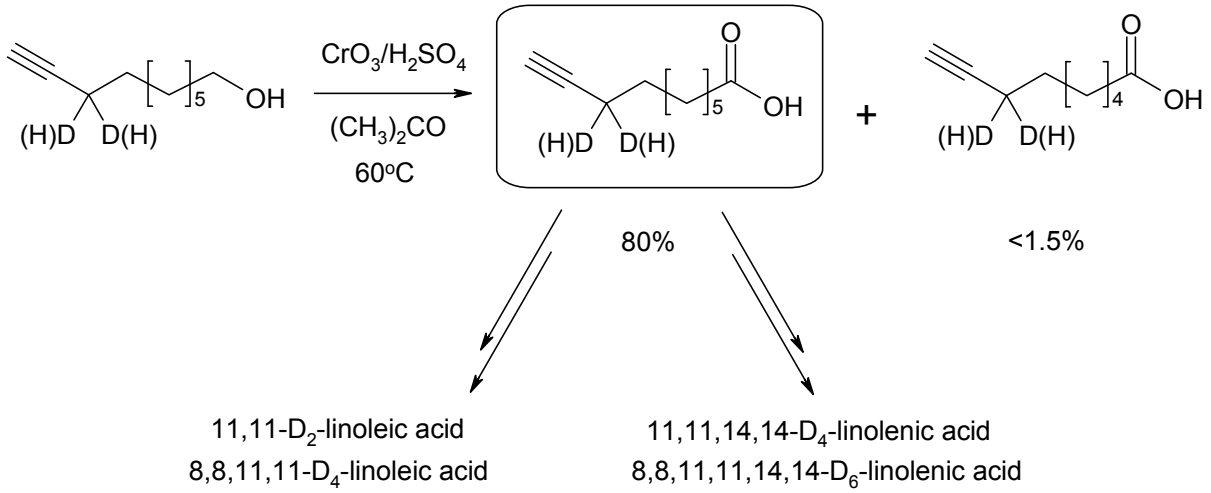
1. *Sh. Hill, K. Hirano, V. V. Shmanai, B. N. Marbois, D. Vidovic, A. V. Bekish, B. Kay, V. Tse, J. Fine, C. F. Clarke, M. S. Shchepinov.* Free Radical Biology & Medicine. 2011, N. 50, c. 130–138.

THE STUDY OF A CARBON SKELETON DEGRADATION ON THE OXIDATION OF PRIMARY ALCOHOLS IN THE SYNTHESIS OF DEUTERATED POLYUNSATURATED FATTY ACIDS

[1]Bekish A.V., [2]Lysenko I.L., [2]Martynenko Yu.V., [2]Kuzmitovich Ya. A.

[1]Belarussian State University, Minsk, Belarus
e-mail: andreibekish@yahoo.com
[2] Institute of Physical Organic Chemistry, NAS of Belarus, Minsk, Belarus

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are playing important role in the physiology and biochemistry of organisms. The approach proposed to the synthesis of the deuterated PUFAs includes the using of dec-9-yn-1-oic acid (also containing deuterium atoms at propargylic position) [1]. During the preparation of the latter by the oxidation of the corresponding primary alcohol we have noticed the formation of the non-8-yn-1-oic acid – an impurity which is hard to separate. Thus, under the classic conditions of Jones oxidation (0^oC, chromic acid in acetone) it relative content exceeds 6%. According to our investigations, the carbon skeleton degradation is the general side reaction on the oxidation of primary alcohols to the corresponding carboxylic acids, like the well known ester formation. For example, after the oxidation of decan-1-ol by nitric acid, the content of nonan-1-oic acid in the acids mixture obtained is 37%. We have optimized the synthesis of dec-9-yn-1-oic acid (along with its 8,8-dideuterated derivative) in order to decrease the degradation product content by variation of different oxidation systems and conditions.



The obtained compounds were used for the preparation of the deuterated analogs of the linoleic and linolenic acids with a suitable for biological studies purity.

References:

1. *Sh. Hill, K. Hirano, V. V. Shmanai, B. N. Marbois, D. Vidovic, A. V. Bekish, B. Kay, V. Tse, J. Fine, C. F. Clarke, M. S. Shchepinov.* // Free Radical Biology & Medicine. 2011, N. 50, c. 130–138.

ЖЕЛЕЗОКАРБОНИЛНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

Белоусов Ю.А., Белоусова Т.А.

Институт элементоорганический соединений им. А. Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия
e-mail: belyur@ineos.ac.ru

Оксид азота - $NO^{\bullet}$ является одним из универсальных и необходимых регуляторов функций клеточного метаболизма. Его недостаток в организме млекопитающих приводит к целому ряду патологических состояний. К экзогенным донорам оксида азота относится большое количество лекарств, активность которых обусловлена именно метаболизмом с выделением NO. К ним относится нитропруссид $[Fe(CN)_5NO]^{2-}$, натриевая соль которого используется в клинической практике. Динитрозильные комплексы железа с тиольными лигандами обнаружены в клетках и тканях, продуцирующих оксид азота, и способны к его обратимому депонированию. Поэтому исследование химических процессов образования и превращения железонитроксильных комплексов имеет фундаментальные и прикладные аспекты.

Методом ЭПР были изучены реакции карбонилов железа с солями нитритов и ациформ нитроалканов. При проведении реакций пентакарбонила железа с натриевыми солями ациформ нитроалканов непосредственно в резонаторе ЭПР-спектрометра при – 80 °С на первых стадиях процесса наблюдается образование радикала вероятной структуры $[Fe(CO)_4C(O)RR'CNO_2]^{\cdot}$ (g = 2.0461 (уширенный синглет))(R и R′= H, Alk). После чего появляется широкий сигнал $Fe(CO)_3NO^{\cdot}$ (g = 2.0327, a_N = 0.021 мТл). Далее в спектре в области g- факторов 2.035 - 2.020 появляются сигналы с мультиплетной структурой, из которой через некоторое время удаётся выделить сформировавшийся квинтет 1:2:3:2:1 радикала $Fe(NO)_2(THF)_2^{\cdot+}$ (g = 2.0217, a_N = 0.016 мТл). Детектируется также гептет 1:3:6:8:6:3:1 радикала $Fe(NO)_3CO^{\cdot}$ (g = 1.9914, a_N = 0.47 мТл). Разрыв связи C-N в нитросоединениях, наблюдающийся в реакциях с карбонилами железа, вероятно связан с тем, что при диспропорционировании исходных соединений Fe(0) до комплексов Fe(+I) - и далее - Fe(+II), вокруг атома железа формируется неорганическая координационная сфера.

$$[Fe(CO)_4C(O)R_2CNO_2]^{\bullet} \longrightarrow [Fe(CO)_4{\cdot}NO_2]^{\bullet} \xrightarrow[-CO_2]{} Fe(CO)_3NO^{\bullet}$$

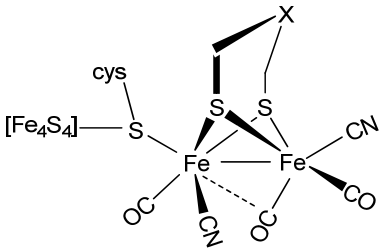
При проведении реакции $Fe(CO)_5$ с $PPN(NO_2)$ через 5 минут после начала в ТГФ при -80° С в спектре ЭПР появляется триплетный сигнал от радикала $Fe(CO)_4NO_2^{\cdot}$ (g = 2.0376 с a_N = 0.132 мТл). Далее, как и в

реакции с нитронат-анионами, наблюдается образование радикалов $Fe(CO)_3NO^{\cdot}$, $Fe(NO)_2(THF)_2^{\cdot+}$ и $Fe(NO)_3CO^{\cdot}$, а также радикала $Fe(CO)_2(NO)_2^{\cdot+}$ (квинтет 1:2:3:2:1, a_N = 0.028 мТл, g = 2.0286). Через полчаса после начала реакции в низкопольной части спектра формируются сигналы кластерных нитрозильных комплексов: $Fe_3(NO)_6(CO)_3^{\cdot+}$ (g = 2.0350) - на промежуточных стадиях процесса и $Fe_3(NO)_8^{\cdot+}$ (g = 2.0360) - на более поздних стадиях.

Таким образом, нитрит- и нитронат-анионы в координационной сфере комплексов Fe(+I) восстанавлива-ются до NO за счёт карбонильных лигандов, окисляющихся до CO_2. При этом происходит:

- формирование координационной сферы атома железа путём замены CO на NO лиганды, которые являются более мягкими, чем исходные нитрит- и нитронат-анионы;
- образование кластерных структур, стабильность которых определяется делокализацией неспаренного электрона по всему металлоостову.

В процессе метаболизма антиангинальные фармакологические препараты на основе нитроэфиров, N-нитропроизводные, алкилнитриты и некоторые другие соединения выделяют нитрит-анион, дальнейшие превращения которого не вполне установлены. Исходя из наших данных, можно предположить, что восстановление NO_2^- до NO происходит в координационной сфере карбонильного комплекса железа. Роль такого комплекса могут выполнять [FeFe]-гидрогеназы, содержащие биядерный железокарбонильный фрагмент.



X = CH_2, NH, O

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 09-03-00535

IRON CARBONYL NITROZYL COMPLEXES

Belousov Yu.A., Belousova T.A.

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

Nitrogen oxide $NO^{\bullet}$ is one of the universal and essential regulators of the functions of cell metabolism. Its deficiency in the organisms of mammals leads to a broad line of pathological conditions. A great deal of drugs which activity is due to just metabolism with the NO elimination belong to the group of exogenous nitrogen donors. Nitroprussid $[Fe(CN)_5NO]^{2-}$, the sodium salt of which is used in the clinical practice is one of them. Dinitrozyl iron complexes with thiol ligands were found in cells and tissues producing nitrogen oxide, and are able for its reversible depositing. Thus, the investigation of chemical processes of formation and transformation of iron-nitroxyl complexes has both fundamental and applied aspects.

The reactions of iron carbonyls with nitrite and nitronate salts have been investigated by the ESR spectroscopy. At the initial stages of the reaction of iron pentacarbonyl with sodium salts of nitronates directly in the resonator of ESR-spectrometer at – 80 °C the formation of a radical of the probable structure $[Fe(CO)_4C(O)RR'CNO_2]^{\cdot}$ (g = 2.0461 (broadened singlet))(R and R′= H, Alk) is observed. Then a wide signal $Fe(CO)_3NO^{\cdot}$ (g = 2.0327, a_N = 0.021 mT) arises. Then the signals with multiplet structure in the g- factor region 2.035 - 2.020 appear, rapidly transforming into the clearly formed quintet 1:2:3:2:1 of the radical $Fe(NO)_2(THF)_2^{\cdot+}$ (g = 2.0217, a_N = 0.016 mT). The heptet 1:3:6:8:6:3:1 of the radical $Fe(NO)_3CO^{\cdot}$ (g = 1.9914, a_N = 0.47 mT) is detected as well. The breakage of C-N bond in nitro compounds observed in the reactions with iron carbonyls may be provided by the fact that under the disproportionation of the initial Fe(0) compounds giving rise to Fe(+I) complexes - and then - Fe(+II) complexes, the inorganic coordination sphere is formed around the iron atom.

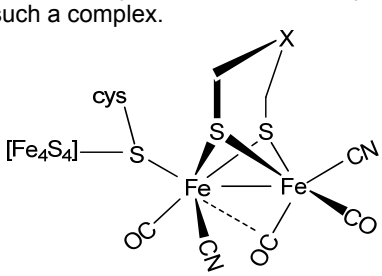
$$[Fe(CO)_4C(O)R_2CNO_2]^{\bullet} \longrightarrow [Fe(CO)_4{\cdot}NO_2]^{\bullet} \xrightarrow[-CO_2]{} Fe(CO)_3NO^{\bullet}$$

Five minutes after the beginning of the reaction of $Fe(CO)_5$ with $PPN(NO_2)$ in THF at -80° C the triplet signal of the radical $Fe(CO)_4NO_2^{\cdot}$ (g = 2.0376 with a_N = 0.132 mT) appears in the ESR spectrum. After that, similar to the reactions with nitronate anions, the formation of the radicals $Fe(CO)_3NO^{\cdot}$, $Fe(NO)_2(THF)_2^{\cdot+}$ and $Fe(NO)_3CO^{\cdot}$is observed, as well as the appearance of the radical $Fe(CO)_2(NO)_2^{\cdot+}$ (quintet 1:2:3:2:1, a_N = 0.028 mT, g = 2.0286). Half an hour after the beginning of the reactions the signals of cluster nitrosyl complexes: $Fe_3(NO)_6(CO)_3^{\cdot+}$ (g = 2.0350) are formed in the in the low-field part of the spectra (at the intermediate stages of the process) and $Fe_3(NO)_8^{\cdot+}$ (g = 2.0360) (at later stages).

Thus, nitrite and nitronate anions are reduced giving NO in coordination sphere of Fe(+I) complexes at the account of carbonyl ligands, oxidized to CO_2. In the course of it the following processes occur:

- the formation of coordination sphere of iron atom due to the substitution of CO by NO ligands, which are more soft than the initial nitrite and nitronate anioins;
- the formation of cluster structures the stability of which is defined by delocalization of unpaired electron throughout the whole metal framework.

In the course of methabolism the anti-anginal pharmacological preparations based upon nitro esters, N-nitro derivatives, alkyl nitrites and some other compounds eliminate nitrite-anion, which further transformation has not been known exactly. On the basis of our data, it can be assumed that the reduction of NO_2^- to NO occurs in the coordination sphere of an iron carbonyl complex. [FeFe]-hydrogenases containing binuclear iron carbonyl fragment can play the role of such a complex.



X = CH_2, NH, O

The work was fulfilled under the financial support of the Russian Foundation for the Fundamental Research, grant № 09-03-00535.

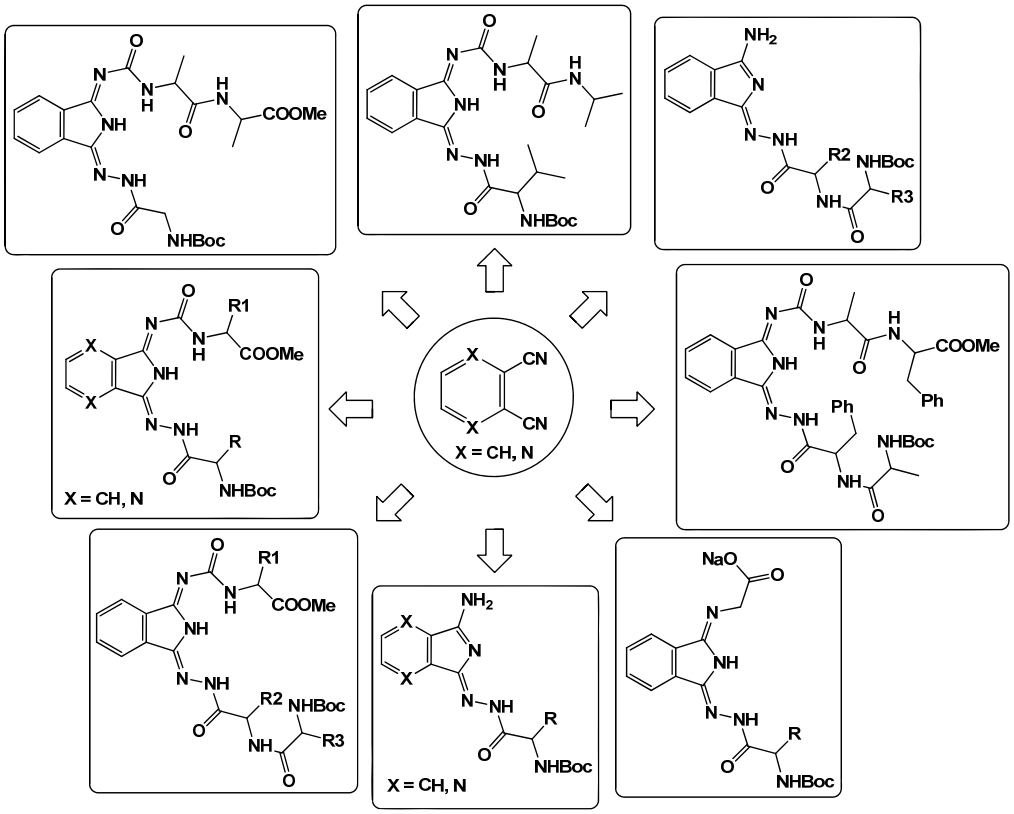
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МИМЕТИКИ, ИМИТИРУЮЩИЕ β-ИЗГИБ, НА ОСНОВЕ 1*H*-ИЗОИНДОЛА И 5*H*-ПИРРОЛО[3,4-*b*]ПИРАЗИНА

[1]Бийцева А.В., [1]Руденко И.В., [1]Ткачук В.А., [1]Гордиенко О.В., [2]Jamart-Grégoire B.,[2]Arrault A.

[1]Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, химический факультет, Киев, Украина,
[2]Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, Nancy, France
e-mail: ov_hordiyenko@univ.kiev.ua

Не смотря на то, что природные пептиды обладают большим потенциалом для применения в медицине, они часто требуют модификации для преодоления некоторых проблем, связанных с современной стратегией доставки лекарств. К желаемым свойствам, которые, однако, часто отсутствуют в природных объектах, относятся: избирательность, устойчивость к протеолитическому расщеплению, эффективность. На преодоление этих проблем направлен дизайн пептидомиметиков с ограниченной конформационной подвижностью пептидной цепи с целью повышения ее стабильности in vivo. Конформация пептида может быть стабилизирована или закреплена введением мостиков между различными частями молекулы. Стабилизация изогнутых структур, имитирующих β-изгиб,α-спираль или β-слой в биологически активных пептидах, была успешно реализована для множества пептидомиметиков. Нами предложен подход к новой разновидности пептидов на основе 1*H*-изоиндола и 5*H*-пирроло[3,4-b]-пиразина как имитирующих изгиб миметиков. Можно ожидать, что подобные соединения будут обладать рядом преимуществ по сравнению с другими описанными миметиками. Они обладают плоской напряженной структурой, а наличие функциональных групп делает возможным фиксацию двух пептидных цепей. Два дополнительных атома азота фрагмента 5*H*-пирроло[3,4-b]пиразина обладают значительным электростатическим потенциалом, и могут обеспечить структурирование путем сворачивания за счет вовлечения в сеть водородных связей, а также могут влиять на фото-физические свойства и растворимость.

Нами разработан эффективный путь поэтапного введения аминокислотных остатков в молекулы 1-имино-1*H*-изоиндол-3-амина и 5-имино-5*H*-пирроло[3,4-b]пиразин-7-амина, исходя из соответствующих динитрилов и гидразидов Boc-аминокислот, последующей реакции полученных производных с изоцианатом аминокислоты, генерированным in situ, с целью включения гетероциклического остатка в пептидную цепь.



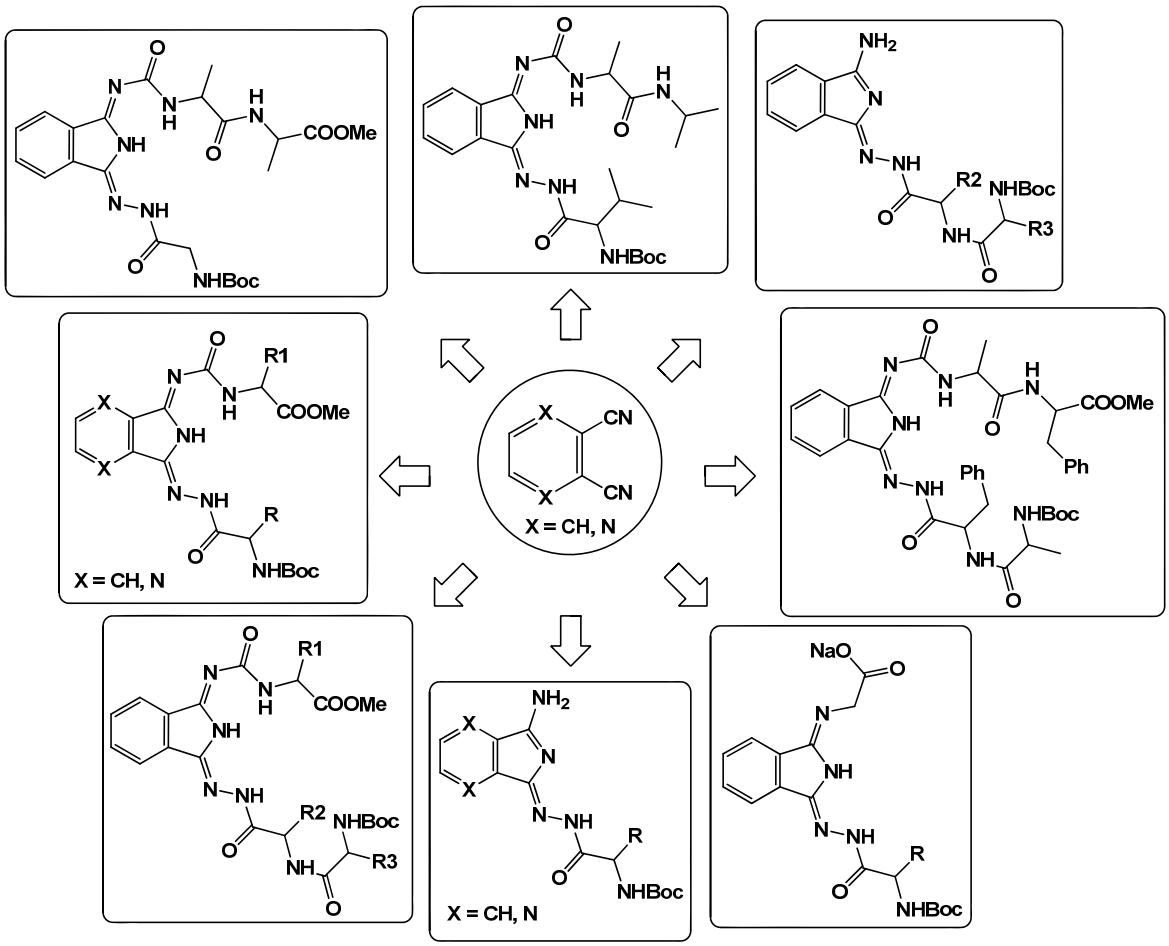
POTENTIAL 1*H*-ISOINDOLE AND 5*H*-PYRROLO[3,4-*b*]PYRAZINE BASED β-TURN MIMICS

[1]Biitseva A.V., [1]Rudenko I.V., [1]Tkachuk V.A., [1]Hordiyenko O.V., [2]Jamart-Grégoire B., [2]Arrault A.

[1]Kyiv National Taras Shevchenko University, Chemistry Department, Kyiv, Ukraine,
[2]Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, Nancy, France
e-mail: ov_hordiyenko@univ.kiev.ua

Although native peptides have a great potential for medical applications, they often need to be modified to overcome certain problems inherent in current drug delivery strategies. The properties desired but often not present or optimized in the native ligand include: selectivity, stability against proteolytic breakdown, potency. These issues have been addressed by the design of peptidomimetics which are compounds bearing a restriction of conformation by limiting the flexibility of the peptide backbone and increasing its stability in vivo. Thus, the conformation of a peptide can be stabilized or fixed by the introduction of bridges between different parts of the molecule. The stabilization of turn structures mimicking β-turn, α-helix or β-sheet in biologically active peptides has been successful in designing a variety of peptidomimetics. An approach to a new variety of 1*H*-isoindole and 5*H*-pyrrolo[3,4-*b*]pyrazine based peptides as peptide turn mimics is proposed here. Such compounds can be expected to present several advantages compared to the other turn mimics described. They exhibit a planar and constraint structure, the presence of functional groups permits the anchorage of two peptide chains. Two extra nitrogen atoms at 5*H*-pyrrolo[3,4-*b*]pyrazine moiety possess a very high electrostatic potential, and could provide involving into the H bond network for the structurization by folding, could modulate photo physical properties, and solubility.

An efficient route of step by step introducing the amino acid residues into 1-imino-1*H*-isoindol-3-amine and 5-imino-5*H*-pyrrolo[3,4-*b*]pyrazin-7-amine skeletons starting from corresponding dinitriles and Boc-amino acid hydrazides, and by further reaction of synthesized derivatives with *in situ* generated amino acid isocyanate in order to incorporate the heterocyclic moiety into a peptide chain was elaborated.



СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛИМЕРНЫХ *NO*-ДОНОРОВ

Бутрим С.М., Бильдюкевич Т.Д., Бутрим Н.С., Юркштович Т.Л.

Учреждение Белорусского государственного университета «НИИ физико-химических проблем», Беларусь
e-mail: butryms@bsu.by

Оксид азота (II) продуцируется из клеток эндотелия и играет основную роль в контроле сосудистого тонуса. Большинство действующих терапевтических агентов, которые увеличивают скорость течения крови путем продуцирования NO, принимаются перрорально и могут давать побочные эффекты. Целью нашего исследования являлся синтез и изучение фармакологических свойств новых полимерных NO-доноров на основе нитроэфира карбоксикрахмала.

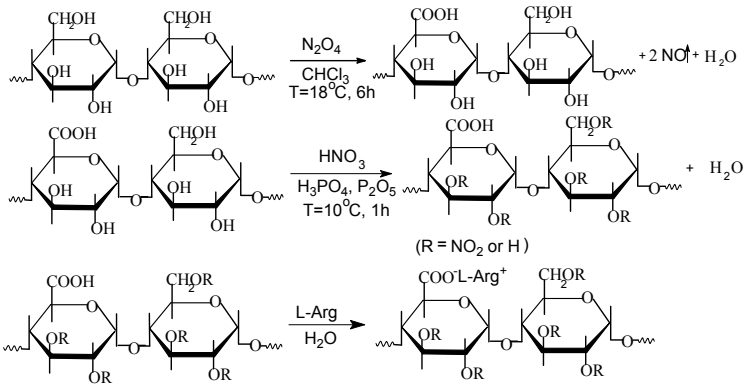
Получение новых препаратов включает несколько химических стадий:

-окисление крахмала в системе оксид азота (IV) – хлороформ;

-этерификация карбоксикрахмала смесью HNO_3 – H_3PO_4 – P_2O_5;

-получение водорастворимых солей (Li^+, Na^+, Mg^{2+}, L-Arg^+) нитроэфира карбоксикрахмала.

Были синтезированы образцы с различной степенью замещения (СЗ): $СЗ_{COOH}$=0.4-0.5, $СЗ_{ONO_2}$ =1.4-1.8 согласно схеме:



Было исследовано влияние полученных полимерных NO-доноров на тонус коронарных сосудов и сократительную активность сердца. В ходе проведения медико-биологических испытаний были изучены эндотелий-зависимые и эндотелий-независимые дилататорные реакции сегментов изолированной аорты (таблица).

Таблица - Кинетические характеристики дилататорных эффектов исследуемых препаратов на изолированные сегменты аорты

№	Препарат	Эндотелий	EC_{50}, мг/л	R_{max}, %
1	Na-НКК (C_N = 9,64%, $СЗ_{COONa}$ = 0,46)	+	8.8±0.4	98.3±2.1
		–	7.1±0.1	97.1±1.1
2	Na-НКК (C_N = 8,90%, $СЗ_{COONa}$ = 0,46)	+	4.0±0.2	81.7±1.2
		–	4.0±0.4	79.6±1.4
3	L-Arg-НКК (C_N = 7,30%,$СЗ_{COOArg}$ = 0,46)	+	7.4±0.4	80.1±2.0
		–	7.1±0.6	77.8±1.9

Примечание: НКК-нитроэфир карбоксикрахмала; C_N – содержание нитроэфирного азота, %; EC_{50} - концентрация, вызывающая 50%-ную от максимальной ответную реакцию; R_{max} - максимальная величина ответной реакции.

Данные препараты можно отнести к эндотелий-независимым вазодилататорам, так как степень расслабления сегментов как с интактным эндотелием, так и деэндотелизованных была сходная.

Дилататорные эффекты на коронарные сосуды оказывают препараты № 3 (R_{max} – 16 %) и № 2 (R_{max} – 6 %). Оба препарата увеличивают и сократительную активность миокарда (R_{max}, соответственно 20 и 9 %) В условиях блокады NO-синтазы L-Name препараты № 3 и № 2 уменьшают коронарный поток и сократимость миокарда. Данные эффекты могут быть связаны с кинетикой высвобождения NO.

Таким образом, наиболее выраженный дилататорный эффект на системные сосуды оказывает препарат №1. Он практически непосредственно не влияет на функциональное состояние сердца и коронарных сосудов. Препараты №2 и №3 обладают гипотензивным и кардиотропным эффектами.

SYNTHESIS AND STUDY OF THE PHARMACOLOGIC PROPERTIES OF POLYMERIC *NO* - DONORS

Butrim S.M., Bil'dyukevich T.D., Butrim N.S., Yurkshtovich T.L.

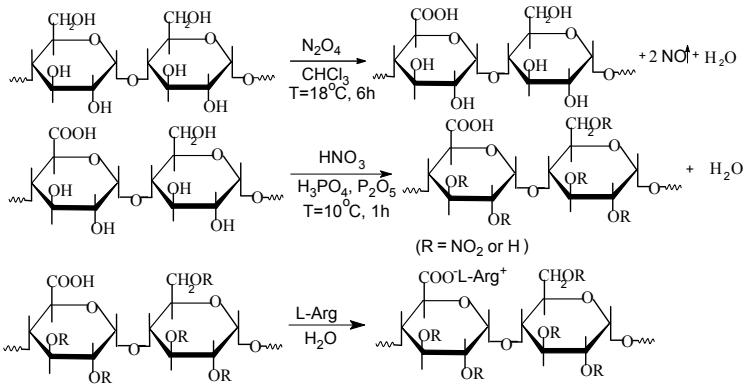
Belarusian State University, Research Institute for Physical Chemical Problems, Minsk, Belarus
e-mail: butryms@bsu.by

Nitric oxide (NO) is produced continuously from the endothelium and plays a pivotal role in the control of vascular tone. Many of the current therapeutic agents that increase blood flow through production of NO have to be taken orally and can produce significant adverse side effects. The aim of our research was synthesis and study of the pharmacologic properties of new polymeric NO - donors on the basis of carboxystarch nitrate ester.

The synthesis of new drugs consists of some chemical stages:

- starch oxidation in the system nitrogen (IV) oxide – chloroform;
- esterification of carboxystarch using mixture HNO_3 – H_3PO_4 – P_2O_5;
- synthesis of carboxystarch nitrate ester water-soluble salts (Li^+, Na^+, Mg^{2+}, L-Arg^+).

Samples with different degree of substitution (DS) were synthesized (DS_{COOH} = 0.4-0.5, DS_{ONO_2} = 1.4-1.8). Reaction scheme of the modification starch was followed:



The influence of synthesized polymeric NO - donors on tone of the coronary vessels and contractive activity of the heart was investigated. The endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilative reactions of the isolated aorta segments at carrying out of the medico-biologic testing were studied (Table).

Kinetic performances of the vasodilative effects of studing samples on the isolated aorta segment

№	Sample	endothelium	EC_{50}, mg/l	R_{max}, %
1	Na-CSN (C_N = 9,64%, DS_{COONa} = 0,46)	+	8.8±0.4	98.3±2.1
		–	7.1±0.1	97.1±1.1
2	Na-CSN (C_N = 8,90%, DS_{COONa} = 0,46)	+	4.0±0.2	81.7±1.2
		–	4.0±0.4	79.6±1.4
3	L-Arg-CSN (C_N = 7,30%, DS_{COOArg} = 0,46)	+	7.4±0.4	80.1±2.0
		–	7.1±0.6	77.8±1.9
4	Mg-CSN (C_N = 7,70%, DS_{COOMg} = 0,43)	+	18.1±0.7	73.8±3.3
		–	21.8±0.5	65.1±2.9
5	Li-CSN (C_N = 9,07%, DS_{COOLi} = 0,44)	+	18.9±1.1	58.1±2.2
		–	13.4±0.7	66.8±1.5

CSN – carboxystarch nitrate ester; C_N – nitrogen (from nitrate ester) content, %; **EC_{50}** - concentration, producing 50% response from maximum; **R_{max}** - maximum value of response.

These drugs belong to endothelium-independent vasodilators, as degree of segments weakening both with intact endothelium and without endothelium was similar.

The vasodilative effects on the coronary vessels were showed by samples №3 (R_{max} – 16 %) and №2 (R_{max} – 6 %). Both samples increased myocardial contractility (R_{max}, accordingly 20 and 9 %). The compounds №3 and №2 decreased coronary stream and myocardial contractility in the NO-synthase L-Name blockade conditions. These effects can be bound up with NO liberation kinetics.

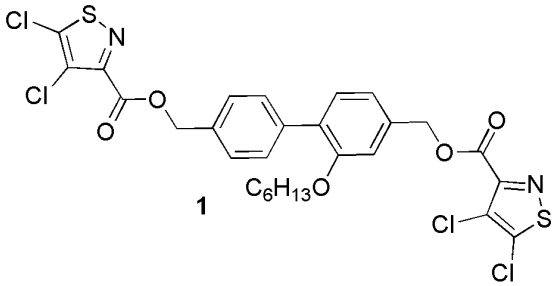
Thus sample №1 showed most powerful vasodilative effect on the system vessels. It didn't influence on the functional heart state and coronary vessels practically. The samples №3 and №2 possessed hypotensive and cardiotropic actions .

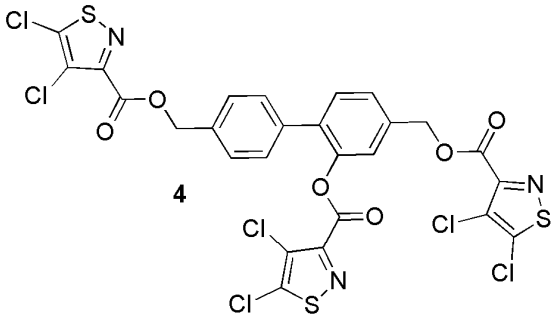
ФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ 2-ГИДРОКСИБИФЕНИЛОВ

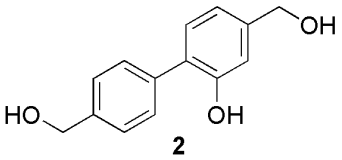
[1]Василевский Д.А., [2]Головченко Л.А., [3]Поткин В.И., [1]Ольховик В.К.

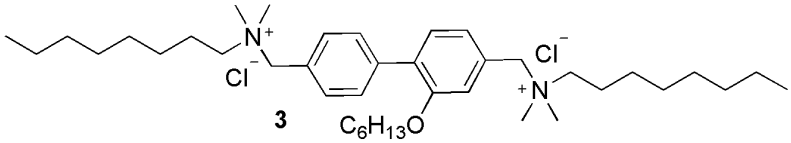
[1]ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси», Минск, Беларусь
e-mail: slavol@ichnm.basnet.by
[2] ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Беларусь
[3]ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Жесткий линейный бифенильный структурный фрагмент присутствует в молекуле большого числа разнообразных (по виду активности, структуре и происхождению) природных и биологически активных соединений [1-3]. Особый интерес представляют препараты для сельского хозяйства, в частности, обладающие фунгицидной активностью. С целью поиска новых групп потенциальных фунгицидных препаратов нами был синтезирован ряд производных 2-гидроксибифенила **1-4**, содержащих различные заместители в положении 4,4'-бифенильного ядра.









Проведен первичный скрининг фунгицидной активности соединений **1-4**. Исследование проведено в лабораторных условиях по отношению к патогенным грибам-возбудителям инфекционного полегания всходов и гниения семян (*Botrytis cinerea* Pers., *Alternaria* Nees, *Fusarium* Link, *Penicillium* Link) методом культивирования грибов на агаризованной питательной среде, содержащей определенные концентрации препаратов. Для количественной характеристики чувствительности патогенных грибов к препаратам использовали показатель EC_{50} – концентрация, вызывающая торможение роста гриба на 50%.

Значения EC_{50}, мкг/мл

Гриб	1	2	3	4
Fusarium sp.	> 1000	> 1000	> 1000	53,7
Botrytis cinerea	398,1	371,5	> 1000	47,9
Penicillium sp.	> 1000	602,6	> 1000	150,0
Alternaria sp.	275,4	281,8	407,4	5,8

Установлено, что образцы в порядке уменьшения степени токсического действия на колонии патогенных грибов располагаются в ряд: **4** > **2** > **1** > **3**. Наиболее сильное токсическое действие на рост колоний патогенных грибов *Fusarium* sp., *Botrytis cinerea, Penicillium* sp. и *Alternaria* sp. оказало вещество **4**. В концентрации 200 мкг/мл оно подавляло рост колоний на 57–95 %.

В лабораторных условиях изучено влияние образцов (протравливание 30 мин в 0,05 и 0,1% растворах) на всхожесть семян ржи озимой и их зараженность плесневыми грибами. Установлено, что наибольшую активность проявляет соединение **4.** Протравливание семян в его 0,1% растворе снижает общую зараженность на 48–76%. Однако после обработки наблюдалось небольшое (7-12%) снижение всхожести семян.

Литература:

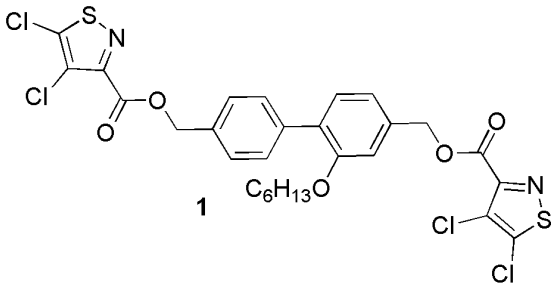
1.*Hong Jin Kim, Ik Soo Lee, Ui Joung Youn* // Biphenylquinolizidine Alkaloids from Lagerstroemia indica - J. Nat. Prod., 2009, 72 (4), pp 749–752.
2.WO 2004/010145 A1
3.WO 2004/035555 A1

FUNGICIDAL ACTIVITY COMPOUNDS BASED ON 2-HYDROXY BIPHENYLS

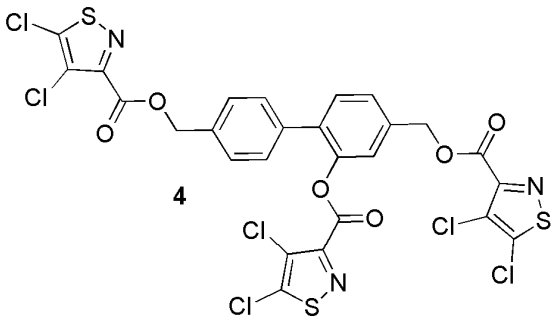
[1]Vasilevskii D.A., [2]Golovchenko L.A., [3]Potkin V.I., [1]Olkhovik V.K.

[1]Institute of Chemistry of New Materials NAS of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: slavol@ichnm.basnet.by
[2] Central Botanical Garden NAS of Belarus, Minsk, Belarus Minsk, Belarus.
[3]Institute of Physical-organic Chemistry NAS Belarus, Minsk, Belarus.

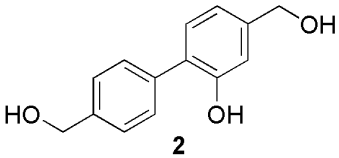
The rigid linear biphenylic fragment is found in big quantities of molecules of various (by king of activity, structure and origin) natural and biologically active compounds [1-3]. Ones of the most interesting are preparations for the agriculture, in particular the preparations with fungicidal activity. With the goal of search of new groups of fungicidal compounds we have synthesized a series of 2-hydrixybiphenyl derivatives with different substituents at 4 and 4' positions of biphenylic core.



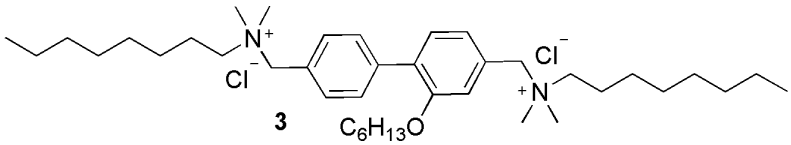
1



4



2



3

Initial screening of fungicidal activity of compounds **1-4** has been fulfilled. The investigation was carried out in laboratory conditions against pathogenic fungi-infectious agents lodging shoots and rotting of seeds (*Botrytis cinerea* Pers., *Alternaria* Nees, *Fusarium* Link, *Penicillium* Link) using method of cultivation of fungi on an agar medium, containing the preparations **1-4** in definite concentrations. The EC_{50} factor (concentration provoking inhibition of fungi growth by 50%) was used for quantitative determination of the sensitivity of pathogenic fungi to preparations.

Value of EC_{50}, mcg/ml

Fungus	1	2	3	4
Fusarium sp.	> 1000	> 1000	> 1000	53,7
Botrytis cinerea	398,1	371,5	> 1000	47,9
Penicillium sp.	> 1000	602,6	> 1000	150,0
Alternaria sp.	275,4	281,8	407,4	5,8

The order of reduce the degree of toxicity of the samples against the colonies of pathogenic fungi was found to be the following: **4** > **2** > **1** > **3**. The strongest toxicity against growth of colonies of pathogenic fungi *Fusarium* sp., *Botrytis cinerea, Penicillium* sp. and *Alternaria* sp showed the compound **4**. It inhibits growth of the colonies by 57-95% in concentration 200 mcg/ml.

The effect of these compounds on germination of seeds of winter rye and fungi infestation was investigated after treatment of the seeds in 0,05 and 0,1% solutions during 30 min. The compound **4** showed the highest activity in this test as well. The treatment of seeds in its 0,1% solution reduces the common infection of the seeds by 48-76%. But the small decrease of germination (7-12%) was observed after the treatment.

References:

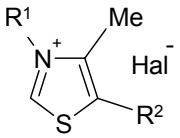
1.*Hong Jin Kim, Ik Soo Lee, Ui Joung Youn* // Biphenylquinolizidine Alkaloids from Lagerstroemia indica - J. Nat. Prod., 2009, 72 (4), pp 749–752.
2.WO 2004/010145 A1
3.WO 2004/035555 A1

СИНТЕЗ БИОАКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТИАЗОЛА

Василенко А.Н., Баля А.Г., Бабий Л.В., Броварец В.С., Вовк А.И.

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: brovarets@bpci.kiev.ua

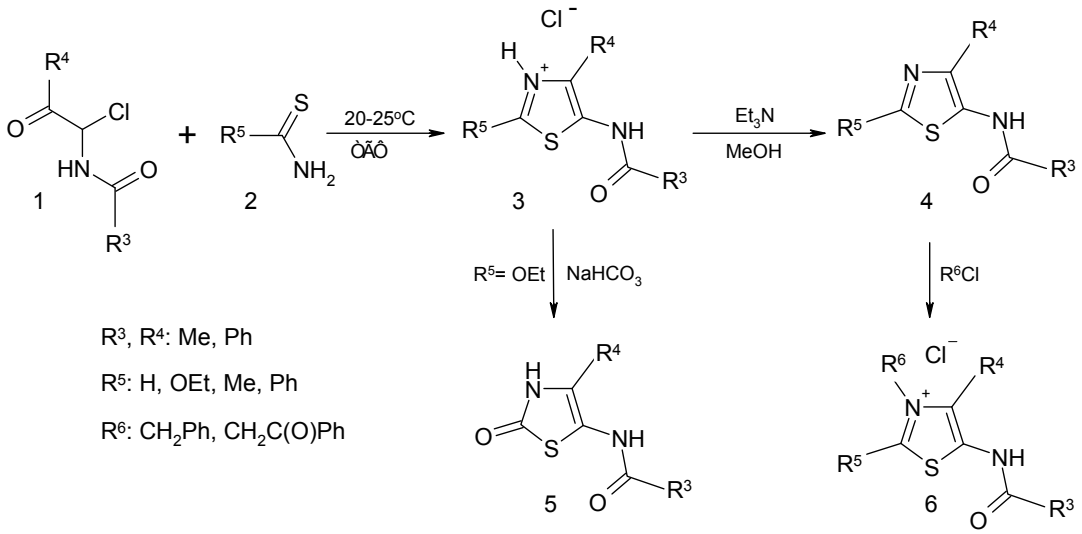
Биоактивность структурных аналогов тиамина(витамина B_1) связана с ингибированием различных ферментов и белков. Нами впервые установлено, что 3,4,5-тризамещенные соли тиазолия являются эффективными ингибиторами ацетилхолинэстеразы из электрического угря (КФ 3.1.1.7) со значениями констант ингибирования в низкомикромолярном диапазоне.



R^1: Me, CH_2Ar, $CH_2C(O)Ar$

R^2: $CH_2CH_2OC(O)Ar$

Для получения других представителей данного класса соединений нами была расширена ранее известная реакция [1], суть которой заключается во взаимодействии хлоркетонов 1 с тиоамидами 2 с образованием 2,4,5-тризамещенных производных тиазола (схема).



R^3, R^4: Me, Ph

R^5: H, OEt, Me, Ph

R^6: CH_2Ph, $CH_2C(O)Ph$

Литература:

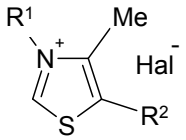
1.*Б.С. Драч, И.Ю. Долгушина, А.В. Кирсанов* // Взаимодействие ω-хлор-ω-ациламидоацетофенонов с тиоацетамидом – ЖОрХ, 1973, т. 9, вып. 2, с. 414 - 419.

SYNTHESIS OF BIOACTIVE DERIVATIVES OF THIAZOLE

Vasilenko A.N., Balya A.G., Babij L.V., Brovarets V.S., Vovk A.I.

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, NAS of Ukraine, Kiev
e-mail: brovarets@bpci.kiev.ua

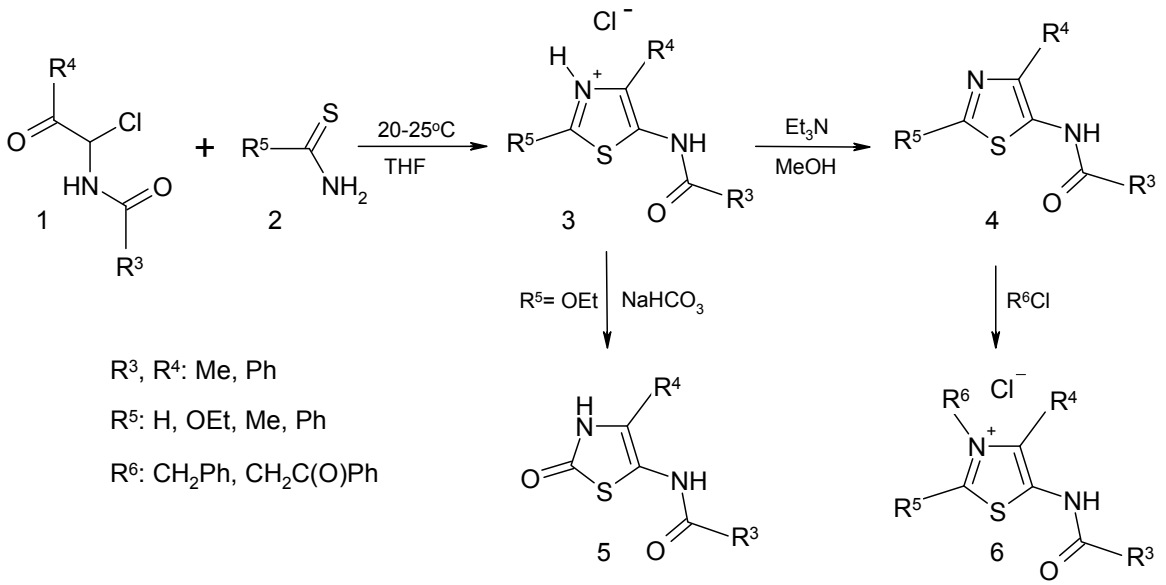
The bioactivity of structural analogues of thyamine (vitamin B1) is connected with inhibition of different enzymes and proteins. We established that the 3,4,5-trisubstituted thiazolium salts can be effective inhibitors of acetylcholinesterase from the electric eel (KF 3.1.1.7) with the values of constants of inhibition within a low-molar range.



R^1: Me, CH_2Ar, $CH_2C(O)Ar$

R^2: $CH_2CH_2OC(O)Ar$

In order to obtain other representatives of this class of compounds the known reaction [1] was used with involves interaction of chloroketones 1 with thioamides 2 to form 2,4,5-trisubstituted thiazole derivatives (see the Chart).



R^3, R^4: Me, Ph

R^5: H, OEt, Me, Ph

R^6: CH_2Ph, $CH_2C(O)Ph$

References:

1. *B. S. Drach, I. Yu. Dolgushina, A. V. Kirsanov* // Interaction of ω-chloro-ω-acylamidoacetophenones with thioacetamides – Zh. Org. Khim., 1973, vol. 9, is. 2, p. 414 - 419.

ВЛИЯНИЕ АДСОРБЦИОННОГО МОДИФИЦИРОВАНИЯ НАНОКРЕМНЕЗЁМА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ И ПОЛИМЕРАМИ НА ЕГО БЕЛОКСОРБИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА

Василенко А.П., Габчак А.Л., Носач Л.В., Воронин Е.Ф.

Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины, Киев, Украина
e-mail:e.voronin@bigmir.net

Аморфный непористый высокодисперсный наноразмерный кремнезём (нанокремнезём) в настоящее время применяется в фармации в качестве активного вещества (субстанции) препаратов сорбционно-детоксикационного действия (энтеросорбентов), показавших свою эффективность при комплексном лечении хирургических, инфекционных, онкологических и некоторых других заболеваний [1]. Совмещение нанокремнезёма с биологически активными соединениями (например, антисептиками) позволяет создавать лекарственные препараты с новыми терапевтическими свойствами. Традиционную лекарственную форму – сложные порошки (pulveres compositus), состоящие из двух (и более) сыпучих лекарственных веществ, имеющих вид мелких частиц, получают простым смешением. Адсорбционное модифицирование, состоящее в образовании моно- или полислоёв БАС на поверхности наноразмерного кремнезёма, позволяет создавать *нанокомпозиты,* то есть многокомпонентные материалы, состоящие из двух (или нескольких) различных дисперсных твердых фаз, в которых основное количество вещества находится на границе раздела [2]. Этим нанокомпозиты отличаются от сложных порошков, в которых существуют только точечные контакты между твёрдыми фазами. Дополнительное покрытие нанокомпозита полимерами позволяет создавать комбинированные препараты с регулируемой фармакокинетикой в виде нанокапсул типа "ядро-оболочка". В то же время такое модифицирование может оказывать отрицательное влияние на протеонектическую способность нанокремнезёма (т.е. способность связывать белки), что является крайне нежелательным, поскольку именно свойство адсорбировать белки и определяет фармацевтическую активность энтеросорбентов [1].

Поэтому нами было исследовано [3-6] влияние модифицирования наноразмерного кремнезёма низкомолекулярными БАС – глюкозой, сорбитом, глицерином, лактозой, маннитом, галактозой, тетрациклином, метронидазолом, а также полимерами, используемыми в фармации – поливинилпирролидоном (ПВП, М = 12000), полиоксиэтиленом (ПОЭ, М = 20000), полиэтиленгликолем (ПЕГ-400, М = 400), поливиниловым спиртом (ПВС, М = 43000), карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ) и крахмалом – на его адсорбционные свойства относительно желатина, который применяется для определения активности препарата сорбционно-детоксикационного действия «Силикс».

Было установлено:

1). Наличие на поверхности нанокремнезёма исследованных низкомолекулярных БАС не снижает его адсорбционую активность относительно желатина.

2). На примере метронидазола было также показано, что иммобилизация БАС на кремнезёме не оказывает отрицательного влияния на их свойства (в данном случае – на антибактериальную активность).

3). Модифицирование кремнезёма гидроксилсодержащими полимерами (ПВС, КМЦ, крахмал) также не уменьшает адсорбцию желатина.

4). В случае апротонных полимеров – ПВП и ПОЭ – наблюдается снижение адсорбции белка симбатно содержанию модификатора вплоть до нулевого значения.

Важно отметить, что другое апротонное вещество с более низкой молекулярной массой – ПЭГ-400 не снижает адсорбцию желатина, что позволяет рассматривать его в качестве перспективного модификатора при создании стабилизированных суспензионных препаратов на основе нанокремнезёма.

Полученные результаты свидетельствуют, что иммобилизация на поверхности наноразмерного кремнезёма низкомолекулярных БАС не снижает его адсобционную активность относительно белка. Влияние полимеров имеет более сложный характер, поэтому для каждого конкретного случая необходимы дополнительные исследования.

Литература:

1. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. акад. НАН Украины Чуйко А.А. К.: Наукова думка, 2003.
2. *Сергеев Г. Б.* Нанохимия. М.: Изд-во МГУ, 2003. — 288 с.
3. *А.П. Василенко, Н.В. Гузенко, М.Л. Малышева, Е.Ф. Воронин.* Влияние поливинилпирролидона и полиоксиэтилена на адсорбцию белков на поверхности нанокремнезёма. – Химия, физика и технология поверхности, 2009, вып.15, с. 111-118.
4. *E.F. Voronin, L. V. Nosach, N.V. Guzenko, E.M. Pakhlov, O.L. Gabchak.* Adsorption modification of nanosilica with non-volatile organic compounds in fluidized state. – Nanomaterials and Supramolecular Structures: Physics, Chemistry, and Applications / eds. A.P. Shpak, P.P. Gorbyk, Springer, London, 2009, p.p. 169-178.
5. *Е.Ф. Воронин, Л.В. Носач, В.М. Гунько.* Газофазное сольвато-стимулированное адсорбционное модифицирование наноразмерного кремнезёма нелетучими органическими соединениями. – Поверхность, 2010, №2 (17), с.221-243.
6. *А.Л.Габчак, И.И.Геращенко, Л.В.Носач, Е.Ф.Воронин, А.Н.Чепляка, Т.П.Осолодченко.* Структура, белоксорбирующие и антимикробные свойства композиций нанодисперсного кремнезёма с 1-(β-оксиэтил)-3-метил-5-нитроимидазолом. – Фізика, хімія і технологія поверхні, 2011, т.2, №1, с.86-92.

EFFECT OF ADSORPTION MODIFYING NANOSILICA WITH BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS AND POLYMERS ON HIS PROTEIN-ABSORPTIVE PROPERTY

Vasilenko A.P., Gabchak A.L., Nosach L.V., Voronin E.F.

Chuiko Institute of Surface Chemistry of NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: e.voronin@bigmir.net

Now amorphous nonporous high-disperse nanoscale silica (nanosilica) is used in pharmacy as active substance of sorption-detoxication preparations (enterosorbents), which have shown their efficiency in complex treatment of surgical, infectious, oncological, and some other diseases [1]. Combining of nanosilica with biologically active compounds (for example, antiseptics) let it possible to create medical products with new therapeutic properties. The traditional medicinal form – combined powders (pulveres compositus) consisting of two (and more) free-flowing medicinal substances that look like small particles, are prepared due to simple mixting. Adsorption modifying which consists in formatin of BAC mono- or polylayers on nanoscale silica surface allows us to create nanocomposites. Tey are the multicomponent materials containing two (or some more) different disperse solids with the main quantity of matter at the interface [2]. This property differs nanocomposites from complex powders in where only dot contacts exist between solid phases. Additional covering nanocoposites with polymers allows us to create combined preparations with adjustable pharmacokinetics as nanocapsules of "core-shell" type. However such modifying can make negative impact on nanosilica capability to bind proteins what is extremely undesirable as the property to adsorb proteins causes pharmaceutical activity of enterosorbents [1].

Therefore the effect has been examined of modifying nanoscale silica with low-molecular BAC – glucose, sorbite, glycerin, lactose, mannitol, galactose, tetracycline, metronidazole, and also with polymers used in pharmacy – polyvinylpyrrolidone (PVP, M = 12000), polyoxyethylene (POE, M = 20000), polyethylene glycol (PEG-400, M = 400), polyvinyl alcohol (PVA, M = 43000), carboxymethyl cellulose (CMC), and starch – on its adsorption properties concerning gelatin [3-6] which is applied to definition of the activity of a sorbtion-detoxication preparation "Silics".

The following has been found:

1). Presence of investigated low-molecular BAC on a nanosilica surface doesn't reduce its adsorption capactivity concerning gelatin.

2). It has been shown that the immobilization of BAC on silica doesn't render negative influence on their properties (in this case – on antibacterial activities), metronidazole being taken as an example.

3). Modifying silica with hydroxylcontaining polymers (PVA, CMC, starch) also doesn't reduce gelatin adsorption.

4). In case of aprotonic polymers – PVP and POE – a decrease in adsorption of protein is observed in parallel to the maintenance of modifier up to zero value.

Then it has been found that another aprotonic substance with lower molecular weight – PEG-400 doesn't reduce gelatin adsorption. It allows us to consider PEG-400 as a perspective modifier for creation of stabilized slurry preparations based on nanosilica.

The results obtained testify that the immobilization of a low-molecular BAC on nanoscale silica surface doesn't reduce it adsorption activity concerning protein. The effect of polymers has more complex character, therefore additional researches are necessary in each concrete case.

References:

1. Medical chemistry and clinical application of silica / Ed. acad. A.A.Chuiko, Naukova dumka, Kiev, 2003.
2. *Sergeev G.B.* Nanochemistry. Moscow, MGU, 2003.
3. *A.P.Vasilenko, N.V. Guzenko, M.L.Malysheva, E.F. Voronin.* Effect of polyvinylpirrolidone and polyoxiethilene on protein adsorption onto nanosilica surface – Chemistry, physics and technology of surface, 2009, N15, p.111-118.
4. *E.F. Voronin, L. V. Nosach, N.V. Guzenko, E.M. Pakhlov, O.L. Gabchak.* Adsorption modification of nanosilica with non-volatile organic compounds in fluidized state. – Nanomaterials and Supramolecular Structures: Physics, Chemistry, and Applications / eds. A.P. Shpak, P.P. Gorbyk, Springer, London, 2009, p.p. 169-178.
5. *E.F. Voronin, L.V. Nosach, V.M. Gun'ko.* Gas-phase solvate-stimulated adsorption modifying of nanoscale silica with non-volatile organic compounds – Surface. 2010, №2 (17), p.221-243.
6. *A.L.Gabchak, I.I.Gerashchenko, L.V.Nosach, E.F.Voronin, A.N.Cheplyaka, T.П.Osolodchenko.* Structure, protein adsorptive and antibacterial properties of compositions based on nano-disperse silica and 1-(β-oxyethyl)-3-methyl-5-nitroimidazole. – Chemistry, physics and technology of surface, 2011, v.2, N1, p.86-92.

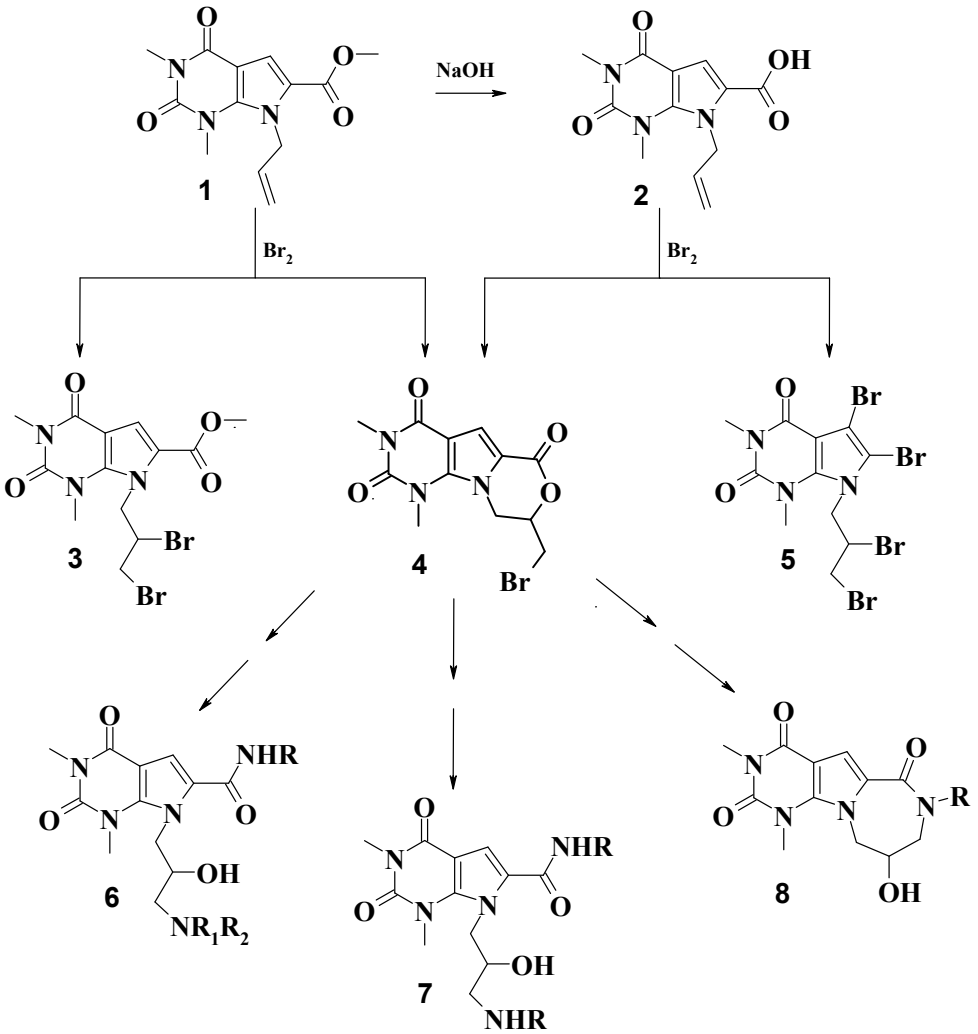
СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ 7-ДЕАЗАПУРИНА С 3-АМИНО-2-ГИДРОКСИПРОПИЛЬНЫМ ФРАГМЕНТОМ

Вервес Е.В., Музычка Л.В., Смолий О.Б.

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: verves@bpci.kiev.ua

Значительное количество синтетических веществ, используемых в качестве лекарств или фармакологических объектов, содержит вицинальный аминоспиртовый фрагмент [1]. Способы синтеза таких соединений хорошо изучены, но иногда введения 3-амино-2-гидроксипропильных заместителей в гетероциклическое кольцо является сложной задачей.

Нами предложен новый подход для получения производных 7-деазапупина, содержащих остатки аминогликолей. Показано, что доступные производные пирроло[2,3-*d*]пиримидина (1, 2), полученные известным способом [2, 3], в мягких условиях вступают в реакцию с бромом с образованием смеси веществ (3, 4, 5), которые легко разделить перекристаллизацией. Продукт бромолактонизации (4) оказался перспективным реагентом для синтеза производных пирроло[2,3-*d*]пиримидина, содержащих 3-амино-2-гидроксипропильные заместители возле атома азота пиррольного кольца (7 - 9). Полученные соединения являются структурными аналогами препаратов с выраженной биологической активностью.



Литератруа:
1.*Машковский М. Д.* Лекарственные средства: в 2 т. / М.Д. Машковский. – М., 2002. – Т. 1. - 540 с.; Т. 2. – 608 с.
2.*О.Б. Смолий, Л.В. Музычка, Е.В. Вервес* ХГС, 1594 (2009)
3.*S. Senda, K. Hirota* Chem. Pharm. Bull. 22, 2921 (1974).

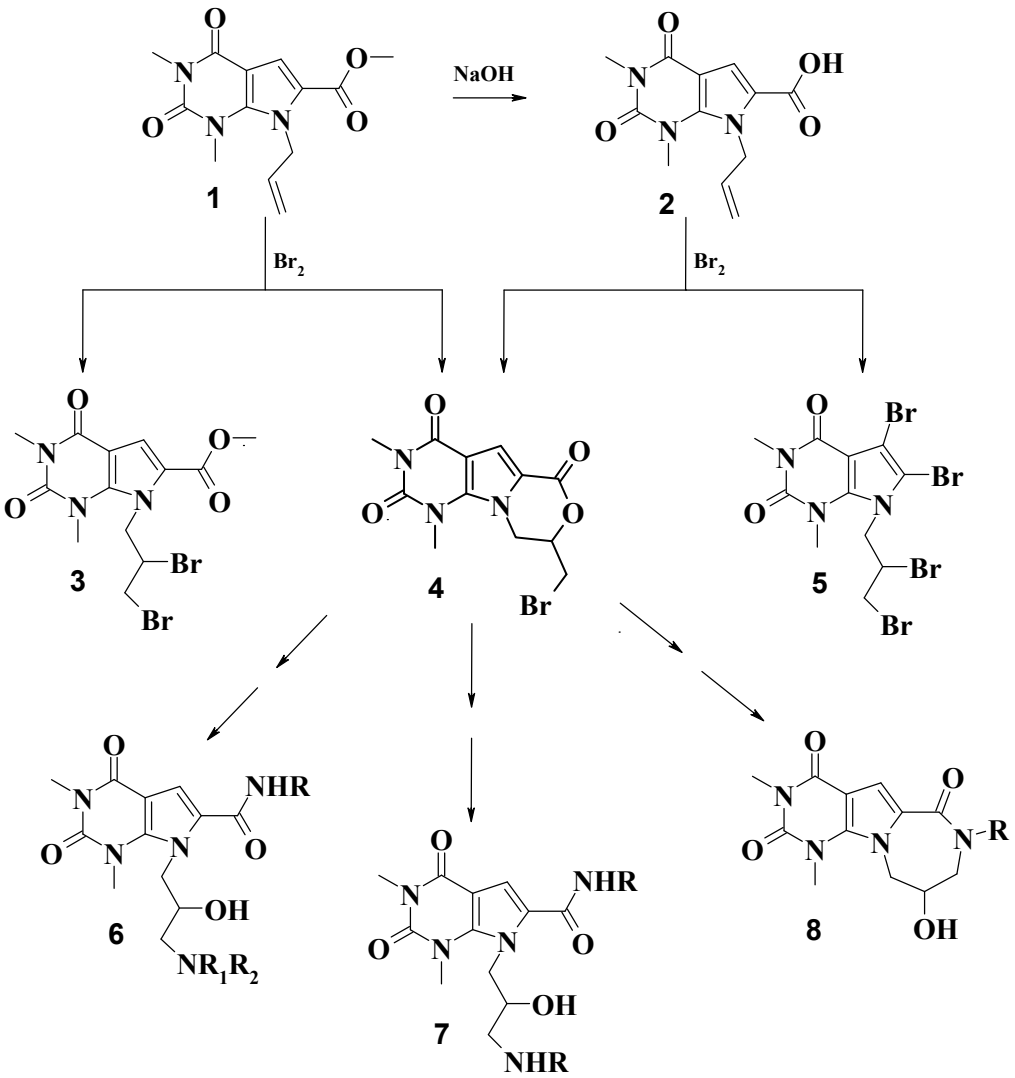
SYNTHESIS OF DERIVATIVES OF 7-DEAZAPURINE WITH 3-AMINO-2-HYDROXYPROPYL FRAGMENTS

Verves E.V., Muzychka L.V., Smolii O.B.

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry National Academy of Science of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: verves@bpci.kiev.ua

A significant number of synthetic substances used as drugs or pharmaceutical sites contain vicinal aminoalcohol fragment [1]. Methods of synthesizing such compounds are well researched, but sometimes the introduction of 3-amino-2-hydroxypropyl into the heterocyclic ring is a difficult task.

We have proposed a new approach for the preparation of derivatives of 7-Diazopurine containing aminoglycol residues. It is shown that available derivatives of pyrrolo[2, 3-*d*]pyrimidine (1, 2), obtained by known methods [2, 3], react with bromine producing a mixture of substances under moderate conditions (3, 4, 5), which can be easily separated by re-crystallization. Product of bromolactonization reaction (4) proved to be a perspective reagent for the synthesis of pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine derivatives containing 3-amino-2-hydroxypropyl substitutes at the Nitrogen atom position of the pyrrolo ring (7 - 9). The resulting compounds are structural equivalents to drugs with significant biological activity.



References:
1.*Машковский М. Д.* Лекарственные средства: В 2-х т. / М.Д. Машковский. – М., 2002. – Т. -540 с.; Т. 2. – 608 с.
2.*О.Б. Смолий, Л.В. Музычка,* Е.В. Вервес. ХГС, 1594 (2009)
3.*S. Senda, K. Hirota.* Chem. Pharm. Bull. 22, 2921 (1974).

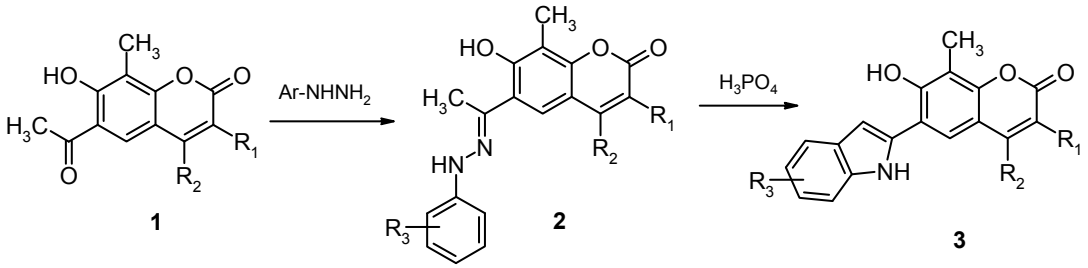
СИНТЕЗ ТА ВИВЧЕННЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ АКТИВНОСТІ 6-(ІНДОЛ-2-ІЛ)КУМАРИНІВ

[1]Галаєв О.І., [1]Василенко О.М., [1]Гаразд М.М., [2]Лесик Р.Б.

[1]Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ, Україна
e-mail: gmm@i.com.ua
[2] Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, Львів, Україна

Актуальним напрямком в області хімії кумаринів являється модифікація системи бензопіран-2-ону шляхом цілеспрямованого введення в його молекулу гетероциклічного залишку. Такого роду дослідження представляють цінність як для теорії органічного синтезу, так і для фармакологічних досліджень нових біологічно активних сполук на основі кумаринової системи. Дана робота присвячена синтезу кумаринів, які містять індольний фрагмент у положенні 6 системи бензопіран-2-ону.

В результаті конденсації 6-ацетилкумаринів **1** з *N*-арилгідразинами [1] з високими виходами утворюються відповідні *N*-арилгідразони **2**. У вказаній реакції було використано *N*-фенілгідразин, *N*-(2-метилфеніл)гідразин, *N*-(3-фторфеніл)гідразин та *N*-(4-бромфеніл)гідразин. Внутрішньомолекулярна гетероциклізація отриманих *N*-арилгідразонів **2** в умовах синтезу Фішера під дією поліфосфорної кислоти при 120ºС приводить до утворення 7-гідрокси-6-(індол-2-іл)-8-метилкумаринів **3**. В спектрах ЯМР синтезованих сполук **3** присутні сигнали протонів, які характерні як для кумаринової системи, так і для утвореного індольного циклу.



R_1, R_2=H, Alkyl, Cycloalkyl; **R_3**= H, Me, F, Br

Протиракова активність одержаних похідних кумаринів вивчалася в рамках міжнародної наукової програми Національного інституту здоров'я США – DTP (Developmental Therapeutic Program) Національного Інституту Раку (NCI, Бетезда, Мериленд, США). Перший етап фармакологічного скринінгу (прескринінгу) полягав у дослідженні протипухлинної активності сполук *in vitro* на 60 лініях ракових клітин, що охоплюють практично весь спектр онкологічних захворювань людини (лінії раку легень, молочної залози, яєчників, товстого кишківника, нирок, простати і ЦПС, а також лейкемії та меланоми) при дії речовини в концентраціях 10^{-5} моль/л.

За результатами прескринінгу було виявлено, що 6-(6-фторіндол-2-іл)-7-гідрокси-4,8-диметилхромен-2-он має високий протипухлинний потенціал, і вказана сполука відібрана для поглибленого *in vitro* фармакологічного скринінгу.

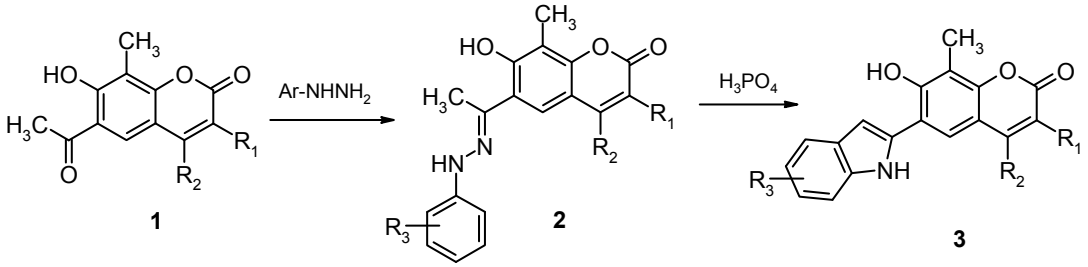
SYNTHESIS AND ANTITUMOR ACTIVITY EVALUATION OF 6-(INDOL-2-YL)-COUMARINS

[1]Galayev O.I.,[1]Vasylenko O.M., [1]Garazd M.M., [2]Lesyk R.B.

[1]Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: gmm@i.com.ua
[2] Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Relevant area in the chemistry of coumarins is a modification of benzopyran-2-one by purposeful introduction of its molecule heterocyclic residue. Such studies represent value for both the theory of organic synthesis and for pharmacological studies of new bioactive compounds based on the coumarins system. This work is devoted to synthesis of coumarins containing the indole fragment in position 6 of benzopyran-2-one system.

As a result of condensation of 6-acetylcoumarins **1** with N-arylhydrazines formed with high yield the corresponding N-arylhydrazones **2**. In this reaction was used 1-phenylhydrazine, 1-(2-methylphenyl)hydrazine, 1-(3-fluorophenyl)hydrazine and 1-(4-bromophenyl)hydrazine. Intramolecular heterocyclization of N-arylhydrazones **2** in a Fischer synthesis under polyphosphoric acid at 120º C led to formation of 7-hydroxy-6-(indol-2-yl)-8-methylcoumarins **3**. In NMR spectra of the synthesized compounds **3** are currently proton signals, which are characteristic for coumarins system, and for the indole formed cycle.



R_1, R_2=H, Alkyl, Cycloalkyl; **R_3**= H, Me, F, Br

Anticancer activity of coumarins derivatives was studied in an international scientific program of the NIH - DTP (Developmental Therapeutic Program) of National Cancer Institute (NCI, Bethesda, Maryland). The first phase of pharmacological screening (prescreening) was the study of antitumor activity of compounds in vitro for 60 cancer cell lines, covering almost the entire range of human cancers (lung cancer lines, breast, ovarian, colon, intestine, kidney, prostate and CPS, as well as leukemia and melanoma) in concentrations of substances in 10^{-5} mol/l. As a result prescreening was found that 6-(6-fluoroindol-2-yl)-7-hydroxy-4,8-dimetylchromen-2-one has a high potential antitumor and indicated compound selected for advanced *in vitro* pharmacological screening.

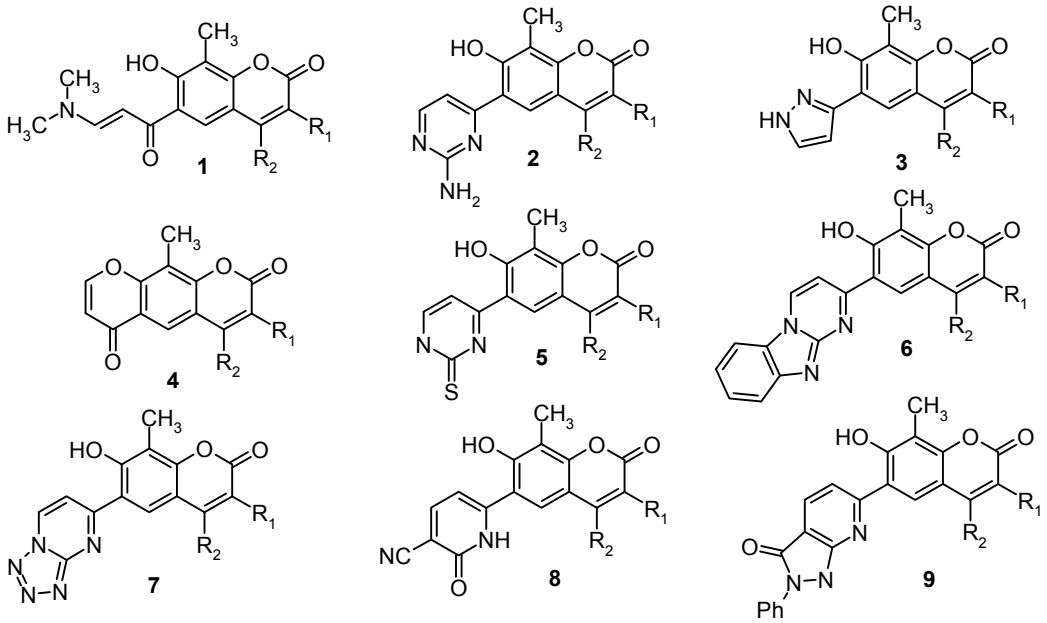
СИНТЕЗ ТА ВИВЧЕННЯ ПРОТИРАКОВОЇ АКТИВНОСТІ 6-ГЕТЕРОАРИЛКУМАРИНІВ

[1]Гаразд Я.Л., [1]Галаєв О.І., [1]Василенко О.М., [1]Огороднійчук О.С., [1]Гаразд М.М., [2]Лесик Р.Б.

[1]Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ, Україна
e-mail: gmm@i.com.ua
[2] Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, Львів, Україна

Одним із шляхів створення нових біологічно активних сполук є синтез аналогів природних біорегуляторів з метою підвищення фармакологічної активності, зокрема шляхом створення в молекулі декількох активних центрів. Перевага таких сполук полягає у тому, що вони близькі за своєю будовою до біохімічних структур живого організму і викликають значно менше побічних ефектів. Серед сполук, які проявили білогічну активність, важливе місце належить похідним кумарину – гетероциклу, який лежить в основі великої кількості природних вторинних метаболітів та синтетичних біологічно активних сполук .

Для синтезу 6-гетарилкумаринів в якості зручних вихідних сполук нами були використані єнамінони **1**, які були отримані в результаті конденсації диметилацеталя *N,N*-диметилформаміду з 6-ацетилкумаринами. Взаємодія в абсолютному піридині єнамінонів з гідрохлоридом гуанідину завершується формуванням системи піримідину та приводить до утворення 6-(2-амінопіримідин-4-іл)хромен-2-онів **2**. 6-(Піразол-3-іл)хромен-2-они **3** були отримані внаслідок обробки спиртового розчину єнамінонів надлишком гідразин моногідрату. Короткотривале нагрівання єнамінонів в оцтовому ангідриді приводить до анелювання піран-4-онового циклу до системи кумарину з утворенням 10-метилпірано[3,2-*g*]хромен-2,6-діонів **4**. В результаті нагрівання спиртового розчину сполук **4** з надлишком гідразину моногідрату відбувається рециклізація системи пірано[3,2-*g*]хромен-2,6-діону з утворенням піразолів **3**. Внаслідок нагрівання спиртового розчину єнамінону **1** та тіосечовини в присутності 1н розчину гідроксиду калію було синтезовано кумарини **5**, які містять в положенні 6 систему піримідин-2-тіону. Взаємодія 2-амінобензімідазолу та 5-амінотетразолу з єнамінонами приводить до утворення 6-гетероарилкумаринів **6** та **7** відповідно. Внаслідок взаємодії єнамінону з ціаноацетамідом в присутності в якості основи етилату натрію було синтезовано похідні кумаринів **8**, які містять в положенні 6 залишок 2-оксо-1,2-дигідропіридин-3-карбонітрилу. В аналогічних умовах під дією етилату натрію єнамінони взаємодіють з 5-аміно-2-феніл-2,4-дигідропіразол-3-оном з утворенням 6-гетероарилкумаринів **9**.



Протипухлинна активність одержаних похідних кумаринів вивчалася в рамках міжнародної наукової програми Національного інституту здоров'я США – DTP (Developmental Therapeutic Program) Національного Інституту Раку (NCI, Бетезда, Мериленд, США). Перший етап фармакологічного скринінгу (прескринінгу) полягав у дослідженні протипухлинної активності сполук *in vitro* на 60 лініях ракових клітин, що охоплюють практично весь спектр онкологічних захворювань людини (лінії раку легень, молочної залози, яєчників, товстого кишківника, нирок, простати і ЦПС, а також лейкемії та меланоми) при дії речовини в концентраціях 10^{-5} моль/л. За результатами прескринінгу було виявлено, що 6-(2-амінопіримидін-4-іл)-7-гідрокси-4,8-диметилхромен-2-он має високий протипухлинний потенціал, і вказана сполука відібрана для поглибленого *in vitro* фармакологічного скринінгу.

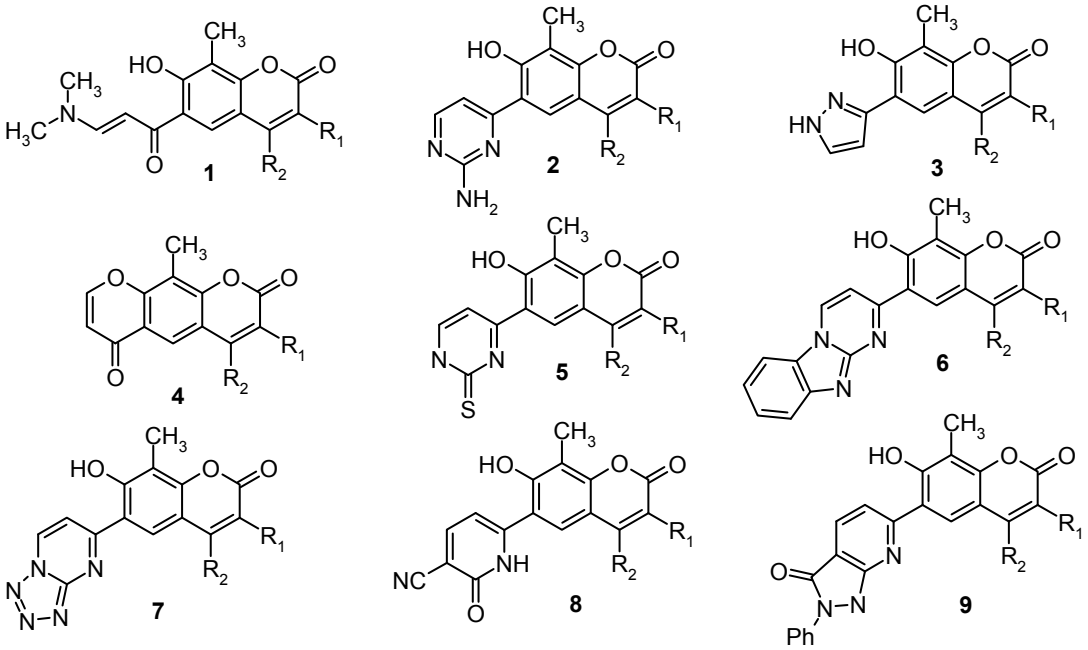
SYNTHESIS AND ANTICANCER ACTIVITY EVALUATION OF 6-HETEROARYLCOUMARINS

[1]Garazd Y.L., [1]Galayev O.I., [1]Vasylenko O.M., [1]Ogorodniychuk O.S., [1]Garazd M.M., [2]Lesyk R.B.

[1]Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: gmm@i.com.ua
[2] Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

One of the ways to create new biologically active compounds is the synthesis of analogs of natural bioregulators to improve the pharmacological activity, particularly through the establishment of the molecule in several active centers. The advantage of such compounds is that they are similar in structure to its biochemical structure of the living organism and cause fewer side effects. Among the compounds that showed activity bilohichnu important place is a derivative of coumarin - heterocycle, which underlies a large number of natural secondary metabolites and synthetic biologically active compounds.

For synthesis of 6-heteroarylcoumarins as a convenient source of compounds we have used enaminones **1**, which were obtained by condensation DMFDMA with 6-acetylcoumarins. Interaction in absolute pyridine enaminones with guanidine hydrochloride followed by the formation of pyrimidine system and leads to of 6-(2-aminopirymidin-4-yl)chromen-2-ones **2**. 6-(Pyrazol-3-yl)chromen-2-ones **3** were obtained after treatment of ethanol solution of enaminones with hydrazine monohydrate. Short-term heating enaminones in acetic anhydride leads to annelation of pyran-4-one cycle to update the system of coumarin with the formation of 10-methylpyrano[3,2-g]chromen-2,6-diones **4**. As a result of heating of alcoholic solution of compounds **4** with hydrazine-monohydrate there is recyclization of the system of pyrano[3,2-g]chromen-2,6-dione with formation of pyrazoles **3**. Coumarins **5** with system of pyrimidine-2-thione in position 6 were synthezised as a result of heating of alcoholic solution of enaminones **1** with thiourea in the presence of 1N solution of KOH. Interaction of benzimidazol-2-amine and tetraazol-5-amine with enaminones results in formation of 6-heteroarylcoumarins **6** and **7**. Coumarins **8**, which contain in position 6 2-oxo-1,2-dihydropyridine-3-carbonitrile ring, were synthesized as a result of interaction of enaminones with 2-cyanoacetamide in presence of NaOEt. In analogical condition under the action of NaOEt enaminones interaction with 5-amino-2-phenyl-2,4-dihydro-3*H*-pyrazol-3-one with formation of heteroarylcoumarins **9**.



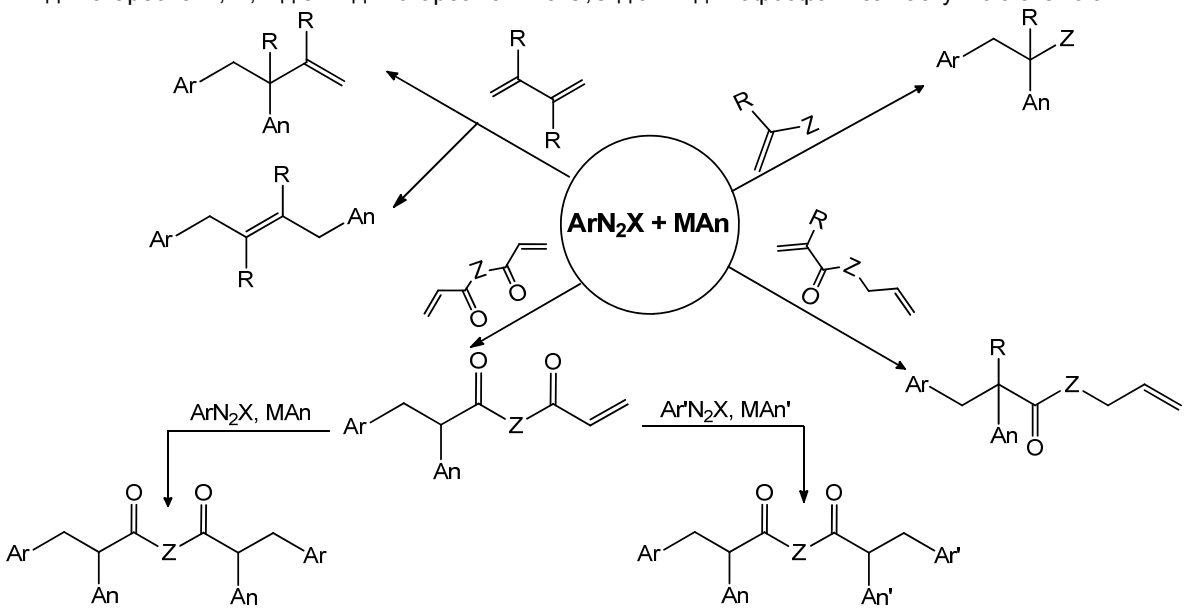
Anticancer activity of coumarins derivatives was studied in an international scientific program of the NIH - DTP (Developmental Therapeutic Program) of National Cancer Institute (NCI, Bethesda, Maryland). The first phase of pharmacological screening (prescreening) was the study of antitumor activity of compounds in vitro for 60 cancer cell lines, covering almost the entire range of human cancers (lung cancer lines, breast, ovarian, colon, intestine, kidney, prostate and CPS, as well as leukemia and melanoma) in concentrations of substances in 10^{-5} mol/l. As a result prescreening was found that 6-(2-aminopyrimidin-4-yl)-7-hydroxy-4,8-dimethychromen-2-one has a high potential antitumor and indicated compound selected for advanced *in vitro* pharmacological screening.

СИНТЕЗ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК РЕАКЦІЄЮ АНІОНАРИЛЮВАННЯ

[1]Грищук Б.Д., [1]Барановський В.С., [2] Климнюк С.І.

[1] Тернопільський національний педагогічний університет ім. Володимира Гнатюка, Тернопіль, Україна.
e-mail: grishchukb@mail.ru
[2] Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського

З метою одержання потенційних біологічно-активних речовин реакцією аніонарилювання моно- і біненасичених сполук синтезовані важкодоступні арилалкільні галогеніди, тіоціанати, ізотіоціанати, О-алкілдитіокарбонати, N,N-діетилдитіокарбамати та О,О-діалкілдитіофосфати за наступною схемою:



X = BF_4, NO_3, HSO_4, Hal; An = Hal, SCN, SC(S)OAlk, SC(S)NEt_2, SP(S)$(OAlk)_2$

Встановлено зв'язок між будовою синтезованих сполук і ступенем прояву антимікробної активності, її селективністю до окремих штамів мікроорганізмів.

Продукти аніонарилювання ненасичених сполук представляють інтерес як синтони для одержання гетероциклічних сполук, що містять фармакофорні фрагменти і представляють інтерес як потенційні біологічно активні речовини. Гетероциклізацією продуктів тіоціанатоарилювання амідів акрилової та метакрилової кислот синтезовані нові 5-арилзаміщені ацетильні та амінопохідні тіазол-4-ону, що характеризуються надзвичайно високою антигрибковою активністю:

R' = H, Me

Серед синтезованих похідних виявлені сполуки з ефективними антимікробними властивостями, окремі з яких можуть бути основами для створення нових антимікробних препаратів широкого спектру дії, а також для одержання полімерних композицій і захисних покриттів з метою надання їм стійкості до біологічної корозії.

Література:

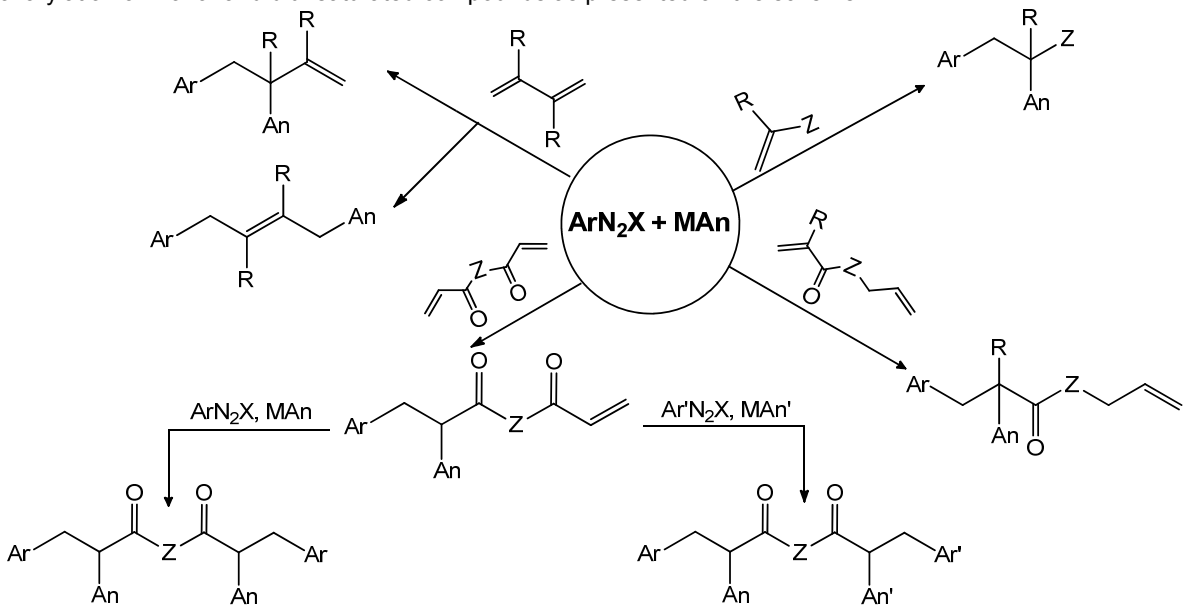
1. *Grishchuk B.D., Gorbovyi P.M., Baranovskyi V.S., Vlasik L.I., Blinder A.V., Klimnuk S.I.* Synthesis of biologically active derivatives of unsaturated compounds by reaction of anionarylation // International conference “New technologies of isolation and application of biologically active substances”. - Alushta, Crimea, Ukraine, 2002, P. 19.

SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS BY ANIONARYLATION REACTION

[1]Gryshchuk B.D., [1]Baranovskyy V.S., [2]Klymniuk S.I.

[1]Ternopil V. Hnatiuk National Pedagogical University Ternopil, Ukraine
e-mail: grishchukb@mail.ru
[2]I. Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University

In order to obtain potentially biologically active substances arylalkyl halides, thiocyanates, O-alkyldithiocarbonates, N, N-diethyldithiocarbamates and O,O-dialkyldithiophosphates were synthesized by anionarylation of mono- and diunsaturated compounds as presented on the scheme:

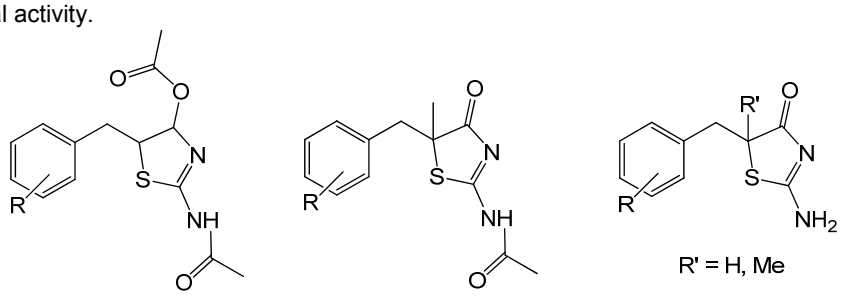


X = BF_4, NO_3, HSO_4, Hal; An = Hal, SCN, SC(S)OAlk, SC(S)NEt_2, SP(S)$(OAlk)_2$

The relationship between the structure of the synthesized compounds and their antimicrobial potency and selectivity in respect to certain strains of microorganisms was established [1].

The anionarylation products of unsaturated compounds are interesting synthons for obtaining heterocyclic compounds bearing pharmacophore fragments – potentially biologically active substances.

New 5-arylsubstituted acetylic and aminoderivatives of thiazole-4-one were synthesized by heterocyclization of compounds prepared by thiocyanatoarylation of acrylamides and methacrylamides. These compounds have very high antifungal activity.



R' = H, Me

Among the synthesized derivatives the compounds with effective antimicrobial properties were found. Some of these compounds may be the basis for new antimicrobial broad-spectrum drugs and to obtain the polymer compositions and protective coating to give them resistance to biological corrosion.

References:

1. *Grishchuk B.D., Gorbovyi P.M., Baranovskyi V.S., Vlasik L.I., Blinder A.V., Klimnuk S.I.* Synthesis of biologically active derivatives of unsaturated compounds by reaction of anionarylation // International conference “New technologies of isolation and application of biologically active substances”. - Alushta, Crimea, Ukraine, 2002, P. 19.

НОВЕ ПОКОЛІННЯ КАРБОКСИЛАТІВ БІОГЕННИХ МЕТАЛІВ ЯК УНІКАЛЬНЕ ДЖЕРЕЛО БІОТИЧНИХ МІКРОНУТРІЄНТІВ ДЛЯ ВИРІШЕННЯ ПРОБЛЕМИ ДЕФІЦИТУ МІНЕРАЛЬНИХ РЕЧОВИН В ХАРЧУВАННІ НАСЕЛЕННЯ

[1]Гуліч М.П., [2]Каплуненко В.Г., [1]Ємченко Н.Л., [2]Косінов М.В.

[1]ДУ«Інститут гігієни та медичиної екології ім. О. М. Марзєєва НАМН України», Київ, Україна
2ТОВ «Наноматеріали і нанотехнології», Київ, Україна
e-mail: gumapa@ukr.net

Найбільш перспективний напрям у вирішенні проблеми ліквідації дефіциту макро- і мікроелементів в харчуванні населення - збагачення мінеральними речовинами продуктів харчування. До цього часу збагачення харчових продуктів мініральними речовинами, як правило, здійснювалося солями неорганічних кислот. Однак вони, за рахунок своєї малої біологічної доступності, засвоюються в організмі тільки в незначній кількості. В результаті, не досягається мета - ліквідація мікроелементного дефіциту в харчуванні населення. Виникає актуальна задача – отримання нових форм мікроелементів для збагачення продуктів харчування.

При цьому, до числа проблем, що вимагатимуть грамотного, науково обгрунтованого вирішення відноситься вибір фізико – хімічних форм біометалів. Цей вибір повинен ґрунтуватися на основі досягнень біонеорганічної хімії щодо з'ясування станів і форм знаходження біометалів («металів життя») в живих організмах. Більшість біометалів присутні та функціонують в організмі у вигляді біокомплексів з аніонами карбонових харчових кислот (лимонної, аскорбінової, бурштанової та інш.). Відомо, що органічні кислоти створюють з біогенними металами добре розчинні біотичні комплекси, які значно підвищують їх біодоступність.

Реальні перспективи кардинального вирішення проблеми ліквідації дефіциту мікроелементів в харчуванні населення шляхом збагачення продуктів харчування за рахунок карбоксилатів біогенних металів з´явилися в результаті інтенсивного розвитку нанотехнологій за останні роки. Досягнення нанотехнологій дають можливість синтезувати такі хімічні сполуки, отримання яких за допомогою класичних хімічних реакцій або неможливо, або проблематично.

Авторами даної роботи створено пріоритетний напрямок в нанотехнології, за допомогою якого отримані карбоксилати харчових кислот навіть таких низькореакційних благородних металів як золото і срібло (цитрати, сукцинати і аскорбати срібла і золота) та надчисті карбоксилати основних харчових кислот біогенних металів (цинку, магнію, марганцю, заліза, міді, кобальту, молібдену) Використання саме нанокарбоксилатів (карбоксилатів, отриманих при використанні нанотехнологій) біометалів , а не їх вільних наночасток знімає проблему можливих ризиків для здоров'я людей високо реакційноспроможних наночасток.

NEW GENERATION OF BIOGENIC METAL CARBOXYLATES AS A UNIQUE SOURCE OF BIOTIC MICRONUTRIENTS FOR THE SOLUTION OF THE PROBLEM OF MINERAL SUBSTANCES DEFICIENCY IN THE NITRITION OF POPULATION

[1]Gulich M.P., [2]Kaplunenko V.G., [1]Yemchenko N.L., [2]Kosinov M.V.

[1] SI "A.N.Marzeiev Institute for Hygiene and Medical Ecology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine
[2]Nanomaterials and Nanotechnologies Ltd., Kyiv, Ukraine
e-mail: gumapa@ukr.net

Enrichment of the foodstuffs with mineral substances is the most perspective direction in the solution of the problem of the liquidation of macro- and microelement deficiency in the nutrition of the population. As a rule, till nowadays enrichment of the foodstuffs with mineral substances has been carried out with the salts of inorganic acids. But at the expense of their small biological availability they are assimilated in the organism only in an insignificant quantity. As a result a liquidation of the microelement deficiency in the nutrition of the population is not achieved. An actual task appears. It is a production of the new forms of microelements for the enrichment of the foodstuffs.

In spite of this, a choice of physical-and-chemical forms of biometals belongs to a number of the problems that requires a competent scientifically rationalized solution. This choice must be founded on the basis of the achievements of bioinorganic chemistry for the clearing up of the states and forms of biometal presence ("metals of life") in alive organisms. The majority of biometals is present and functions in the organism as the biocomplexes with carboxylic acid complexes (citric, ascorbic, succinic etc.). It is known that organic acids create well soluble biotic complexes with the biogenic metals which significantly increase their bioavailability.

The real perspectives of cardinal solution of the problems of microelements deficiency liquidation in the nutrition of the population by means of the enrichment of the foodstuffs at the expense of carboxylates of biogenic metals resulted from the intensive development of nanotechnologies for the last years. Achievements of nanotechnologies give a possibility to synthesize such chemical compounds which generation is impossible or problematic with the help of classical chemical reactions.

The authors of a given work created a prior direction in nanotechnology which helped to produce the carboxylates of nutrition acids even such low reaction metals as gold and silver (citrates, succinates, and ascorbates of silver and gold) and extra pure carboxylates of the main nutrition biogenic metals (zinc, magnesium, manganese, iron, copper, cobalt, molybdenum). Application of just nanocarboxylates (carboxylates produced with the help of nanotechnologies) of biometals, but not their free nanoparticles, liquidates a problem of the possible risks of nanoparticles with the high reaction possibilities for a human health.

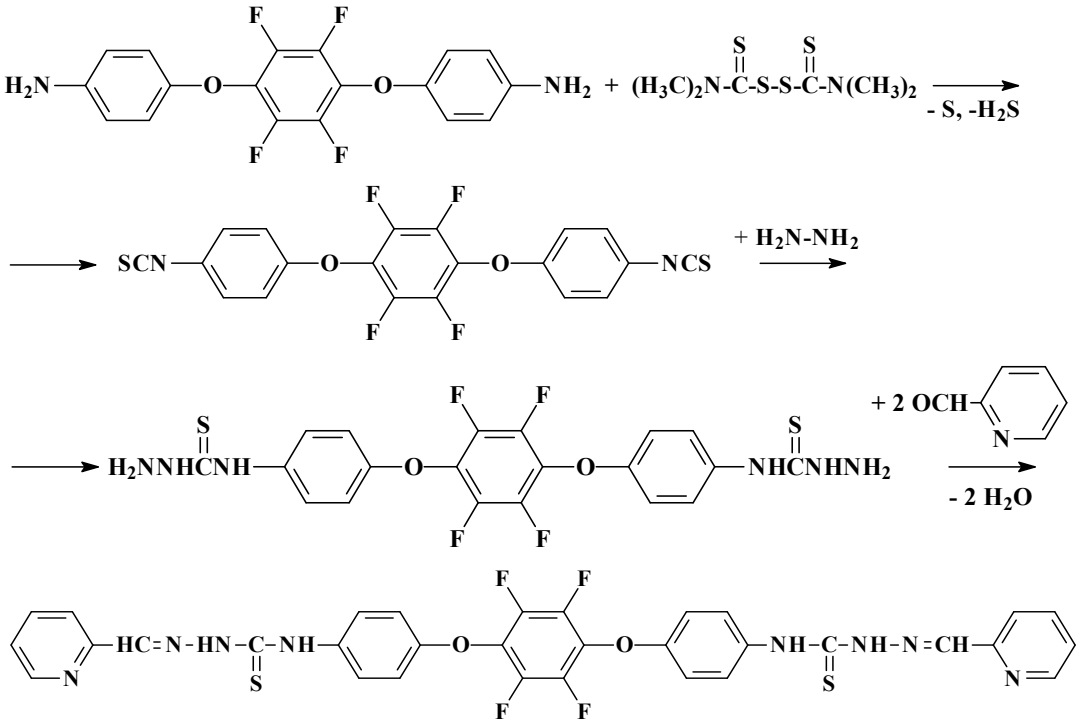
N,N'-[4,4'-(ПЕРФТОРО-1,4-ФЕНИЛЕН)-БИС(ОКСИ)-БИС(4,1-ФЕНИЛЕН)]-БИС[2-(ПИРИДИН-2-ИЛМЕТИЛЕН)ГИДРАЗИНКАРБОТИОАМИД] В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРА РОСТА И РАЗМНОЖЕНИЯ КЛЕТОК LNCAP РАКА ПРОСТАТЫ

[1]Гуля А.П. , [1]ЖалбэА.В., [2]Пахонцу Е., [1] Барба Н.А., [1]Цапков В.И., [3]Софрони Л.В., [4]Ван Стаден Р.И.

[1]Молдавский государственный университет, Кишинев, Республика Молдова
e-mail:vtsapkov@gmail.com
[2]Бухарестский медицинский университет, Бухарест, Румыния
[3]Институт Онкологии Республики Молдова, Кишинев, Республика Молдова
[4] Национальный Научно-исследовательский Институт Электрохимии и Конденсированной Материи, Тимишоара, Румыния

Из литературы известно, что многие производные тиосемикарбазида находят широкое применение в медицинской практике, в качестве противораковых, противомикробных, противотуберкулёзных, противогрибковых и др. препаратов. Во многих случаях биологическая активность этих веществ хорошо согласуется с их строением. В связи с этим синтез и изучение биологических свойств новых производных тиосемикарбазида представляет как научный, так и практический интерес.

В связи с этим целью настоящей работы явился синтез и изучение противораковых свойств N,N'-[4,4'-(перфторо-1,4-фенилен)-бис(окси)-бис(4,1-фенилен)]-бис[2-(пиридин-2-илметилен)-гидразин-карботиоамида]. Синтез конечного вещества осуществлен по следующей схеме:



Известно, что многие производные тиосемикарбазида, селективно ингибируют рост злокачественных новообразований. В связи с этим ,,in vitro" на клетках рака простаты (LNCaP). была изучена противораковая активность N,N'-[4,4'-(перфторо-1,4-фенилен)-бис(окси)-бис(4,1-фенилен)]-бис[2-(пиридин-2-илметилен)-гидразин-карботиоамида]. Противораковая активность изучалась по стандартной методике, описанной в [1]. Установлено, что исследуемое вещество ингибирует рост данного вида клеток на уровне химиотерапевтических средств, применяемых в медицине при профилактике и лечении соответствующего вида рака. При концентрации 10^{-5} моль/л оно вещества ингибирует рост и размножение 100% раковых клеток, при концентрации 10^{-6} моль/л тиосемикарбазон ингибирует 65,3% клеток, а при концентрации 10^{-7} моль/л не проявляет противораковой активности.

Выявленные свойства N,N'-[4,4'-(перфторо-1,4-фенилен)-бис(окси)-бис(4,1-фенилен)]-бис[2-(пиридин-2-илметилен)гидразинкарботиоамида предствляют интерес для медицины с точки зрения расширения спектра ингибиторов роста и размножения клеток LNCaP рака простаты.

Работа выполнена при финансовой поддержке Международного проекта 10.820.09.10/RoA

Литература :

1. *Y. Laplante., D. Poirier //* Proliferative effect of androst-4-ene-3,17-dione and its metabolites in the androgen-sensitive LNCaP cell line - Steroids. 2008, Vol, 73. № 3, P. 266-271.

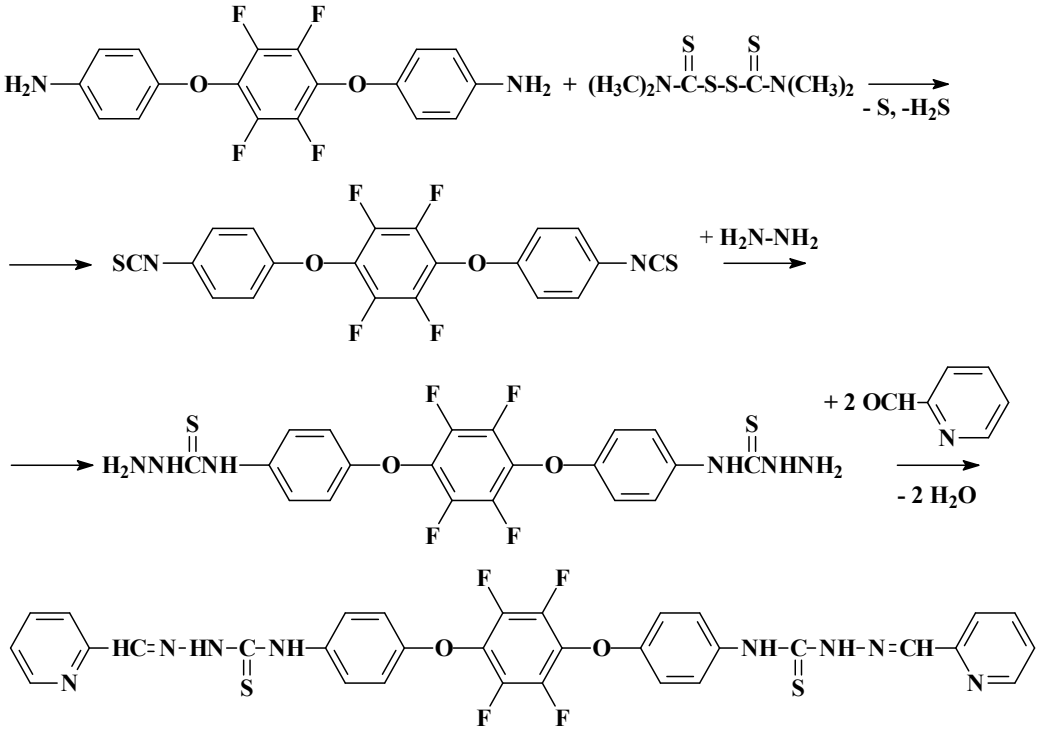
N,N'-[4,4'-(PERFLUORO-1,4-PHENYLENE)-BIS(OXY)-BIS(4,1-PHENYLENE)]-BIS[2-(PYRIDINE-2-YLMETHYLENE)HYDRAZINECARBOTHIOAMIDE] AS INHIBITOR OF GROWTH AND REPRODUCTION OF LNCAP PROSTATE CANCER CELLS

[1]Gulea A.P., [1]Jalba A.V., [2] Pahontu E., [1]Barba N.A., [1]Tsapkov V.I., [3]Sofroni L.V., [4]Van Staden R.I.

[1]Moldova State University, Chisinau, Moldova,
e-mail: vtsapkov@gmail.com
[2]University of Medecine, Bucharest, Romania
[3]Institute of Oncology, Chisinau, Moldova
[4]National Institute for Research in Electrochemistry and Condensed Matter, Timisoara, Romania

It is well known that many thiosemicarbazide derivatives are widely used in medicine as anticancer, antimicrobial, antituberculosis, antifungal and other drugs. In many cases, the biological activity of these substances is consistent with their structure. In this regard, the synthesis and study of the biological properties of new thiosemicarbazide derivatives is of both scientific and practical interest.

The aim of the given work is the synthesis and study of the anticancer properties of N,N'-[4,4'-(perfluoro-1,4-phenylene)-bis(oxy)-bis(4,1-phenylene)]-bis[2-(pyridine-2-ylmethylene)-hydrazine-carbothioamide]. The synthesis of the final substance has been carried according to the following scheme:



Many thiosemicarbazide derivatives selectively inhibit the growth of malignant tumors. In this connection the anticancer activity of N,N'-[4,4'-(perfluoro-1,4-phenylene)-bis(oxy)-bis(4,1-phenylene)]-bis[2-(pyridine-2-ylmethylene)-hydrazine-carbothioamide] has been studied “in vitro” on prostate cancer cells (LNCaP). The anticancer activity study has been performed according to the standard method described in [1]. It has been established that the analyzed substance inhibits the growth of this type of cells at the level of chemotherapeutic drugs used in medicine for the prevention and treatment of the corresponding type of cancer. At the concentration 10^{-5} mol/l the substance inhibits the growth and reproduction of 100% of cancer cells, at the concentration 10^{-6} mol/l the thiosemicarbazone inhibits 65,3% of cells, and at the concentration 10^{-7} mol/l does not display anticancer activity.

The identified properties of N,N'-[4,4'-(perfluoro-1,4-phenylene)-bis(oxy)-bis(4,1-phenylene)]-bis[2-(pyridine-2-ylmethylene)-hydrazine-carbothioamide] are important for expanding the arsenal of inhibitors of growth and reproduction of LNCaP prostate cancer cells.

This research was supported by the International Project 10.820.09.10/RoA.

References:

1. *Y. Laplante., D. Poirier* // Proliferative effect of androst-4-ene-3,17-dione and its metabolites in the androgen-sensitive LNCaP cell line - Steroids. 2008, Vol, 73. № 3, P. 266-271.

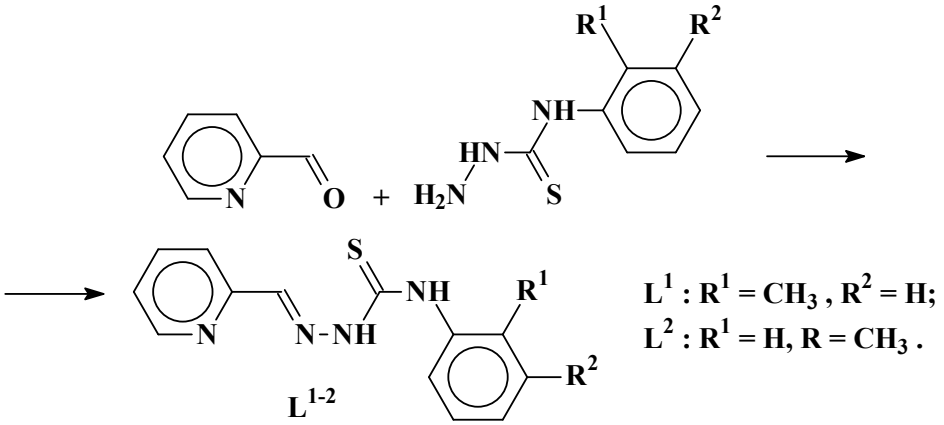
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ КОМПЛЕКСОВ МЕДИ(II) С N-(2-МЕТИЛФЕНИЛ)ТИОСЕМИКАРБАЗОНОМ И N-(3-МЕТИЛФЕНИЛ)-ТИОСЕМИКАРБАЗОНОМ 2-ФОРМИЛПИРИДИНА

[1]Гуля А.П., [1]Виеру В.В, [1]Жалбэ А.Б., [1]Цапков В.И., [1]Быркэ М.С., [2]Софрони Л.В.

[1]Молдавский государственный университет, Кишинев, Молдова.
e-mail: mbirca@gmail.com
[2]Институт Онкологии Республики Молдова, Кишинев, Молдова

Производные тиосемикарбазида находят широкое применение в медицине при лечении различных видов заболеваний [1]. Все они обладают широким набором донорных атомов и образуют с ионами металлов разнообразные по составу, строению и свойствам биоактивные координационные соединения. В связи с этим синтез и исследование новых комплексов биометаллов с подобными лигандами представляет как научный, так и практический интерес.

Целью настоящей работы является нахождение оптимальных условий синтеза, установление состава, строения, физико-химических и противоопухолевых свойств N-(2-метилфенил)тиосемикарбазона (L^1) и N-(3-метилфенил)-тиосемикарбазона (L^2) 2-формилпиридина и комплексов меди(II) с этими лигандами общей формулы $Cu(L^{1-2}-H)$, где X- Cl^-, Br^-, NO_3^-. Ссинтез тиосемикарбазонов осуществлен по схеме :



а комплексы получены в результате реакции солей меди(II) с выше приведенными тиосемикарбазонами, взятыми в молярном отношении 1:1.

Противоопухолевый эффект тиосемикарбазонов L^1 и L^2 и комплексов меди (II) изучали ,,*in vitro*" на клетках рака молочной железы (MCF-7) и простаты (LNCaP) по методике описанной в [2, 3]. Было установлено, что при концентрации 10^{-5} моль/л оба исходных тиосемикарбазона (L^1 и L^2) ингибируют на 100% рост и размножение перечисленных выше видов раковых клеток. При концентрации 10^{-6} моль/л тиосемикарбазон L^1 ингибирует 36,9 ± 3,8% клеток рака молочной железы (MCF-7) и 13,5 ± 5,2% клеток рака простаты (LNCaP), а L^2 - 48,3 ± 3,0 и 45,4% ± 1,9% соответствующих клеток. При концентрации 10^{-7} моль/л тиосемикарбазон L^1 ингибирует 25,1 ± 3,8 и L^2 -18,4 ± 7,7% клеток рака молочной железы (MCF-7) и не проявляют активность по отношению к клеткам рака простаты. При концентрации 10^{-8} моль/л ни одно из веществ, не проявляют противоопухолевую активность по отношению ко всем видам раковых клеток. Было установлено, что на противоопухолевую активность испытанных веществ влияет положение метильной группы в фенильном фрагменте тиосемикарбазона : замена позиции 2 на 3 приводит к снижению противоопухолевой активности по отношению к клеткам рака молочной железы (MCF-7) и к повышению активности по отношению к клеткам рака простаты (LNCaP). Противоопухолевый эффект комплексов меди(II) не превышает активность лигандов и находится в вышеприведенных пределах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Международного проекта 10.820.09.10/RoA

Литература :

1. *М. Д Машковский.* Лекарственные средства, Москва : Новая волна. 2008. 1206с.
2. *A. Gulea, D. Poirier D.,J. Roy., V. Stavila , I. Bulimestru, V. Tapcov, M. Birca, L. Popovschi // In vitro* antileukemia, antibacterial and antifungal activities of some 3d metal complexes : Chemical synthesis and structure –activity relationships - Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2008, V. 23, №6, P. 806-818.
3. *Y. Laplante., D. Poirier* // Proliferative effect of androst-4-ene-3,17-dione and its metabolites in the androgen-sensitive LNCaP cell line - Steroids. 2008, Vol, 73. № 3, P. 266-271.

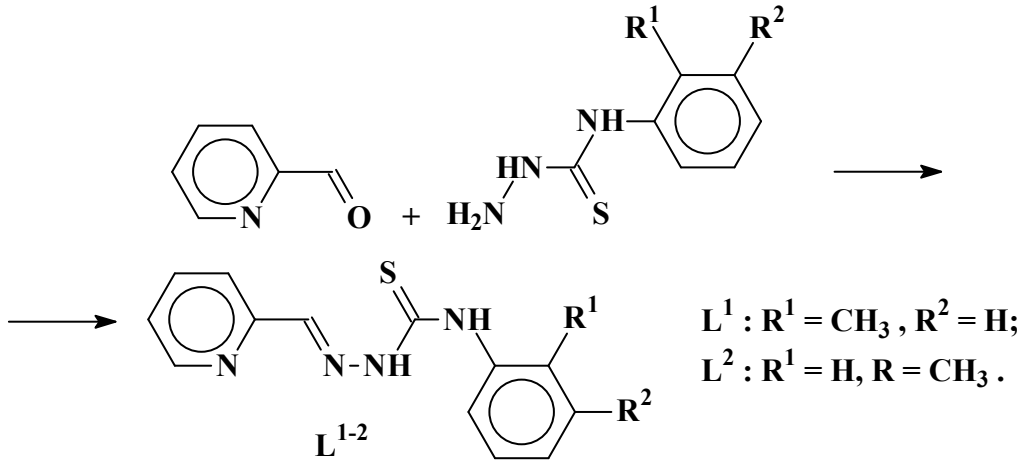
THE ANTICANCER EFFECT OF COPPER(II) COMPLEXES WITH 2-FORMYLPYRIDINE N-(2-METHYLPHENYL)THIOSEMICARBAZONE AND N-(3-METHYLPHENYL)-THIOSEMICARBAZONE

[1]Gulea A.P., [1]Vieru V.V., [1]Jalba A.B., [1]Tsapkov V.I., [1]Birca M.S., [2]Sofroni L.V.

[1]Moldova State University, Chisinau, Moldova
e-mail: mbirca@gmail.com
[2]Institute of Oncology, Chisinau, Moldova

Thiosemicarbazide derivatives are widely used in medicine to treat various types of diseases [1]. They all possess a wide range of donor atoms and form with metal ions bio-active coordination compounds of various composition, structure and properties. In this connection, the synthesis and study of new biometal complexes with similar ligands is of both scientific and practical interest.

The aim of the given work is to establish optimum conditions of synthesis, to determine the composition, structure, physicochemical and anticancer properties of 2-formylpyridine N-(2-methylphenyl)thiosemicarbazone (L^1) and N-(3-methylphenyl)-thiosemicarbazone (L^2) and copper(II) complexes with these ligands of general formula Cu(L^{1-2}-H), where X- Cl^-, Br^-, NO_3^- .



The anticancer effect of thiosemicarbazones L^1 and L^2, and of copper(II) complexes was studied "*in vitro*" on breast (MCF-7) and prostate (LNCaP) cancer cells [2, 3]. It has been established that at the concentration 10^{-5} mol/l both initial thiosemicarbazones (L^1 and L^2) inhibit at 100% the growth and reproduction of the above mentioned cancer cells. At the concentration 10^{-6} mol/l the thiosemicarbazone L^1 inhibits 36,9 ± 3,8% of breast cancer cells (MCF-7) and 13,5 ± 5,2% of prostate cancer cells (LNCaP), but L^2 - 48,3 ± 3,0 and 45,4% ± 1,9% of the respective cancer cells. At the concentration 10^{-7} mol/l the thiosemicarbazone L^1 inhibits 25,1 ± 3,8 and L^2 - 18,4 ± 7,7% of breast cancer cells (MCF-7), but do not display activity towards the prostate cancer cells. At the concentration 10^{-8} mol/l these substances do not display anticancer activity towards all types of cancer cells. It has been established that the anticancer activity of the studied substances is influenced by the position of the methyl group in the thiosemicarbazone phenyl fragment: the replacement of position 2 by 3 decreases the anticancer activity towards breast cancer cells (MCF-7) and increases the anticancer activity towards prostate cancer cells (LNCaP). The anticancer effect of copper(II) complexes does not exceed the ligands activity and varies in the above mentioned limits.

This research was supported by the International Project 10.820.09.10/RoA

References:

1. *М. Д Машковский*. Лекарственные средства, Москва: Новая волна. 2008. 1206с.
2. *A. Gulea, D. Poirier D.,J. Roy., V. Stavila , I. Bulimestru, V. Tapcov, M. Birca, L. Popovschi // In vitro* antileukemia, antibacterial and antifungal activities of some 3d metal complexes : Chemical synthesis and structure – activity relationships - Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2008, V. 23, №6, P. 806-818.
3. *Y. Laplante., D. Poirier //* Proliferative effect of androst-4-ene-3,17-dione and its metabolites in the androgen-sensitive LNCaP cell line - Steroids. 2008, Vol, 73. № 3, P. 266-271.

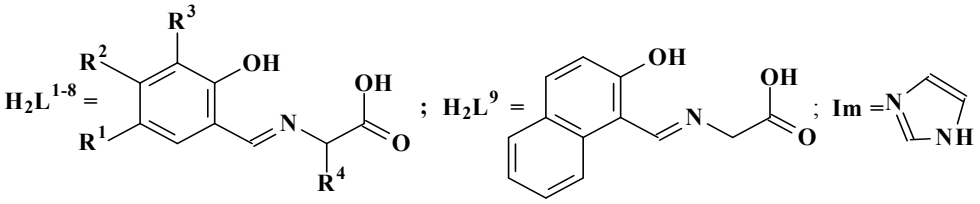
СИНТЕЗ И ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ВНУТРИКОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ МЕДИ(II) СОДЕРЖАЩИХ ИМИДАЗОЛ И ПРОДУКТЫ КОНДЕНСАЦИИ α-АМИНОКИСЛОТ С САЛИЦИЛОВЫМ АЛЬДЕГИДОМ И ЕГО ЗАМЕЩЕННЫМИ

[1]Гуля А.П. , [2]Лозан-Тыршу К.С. , [1]Цапков В.И., [2]Рудик В.Ф.

[1]Молдавский государственный университет, Кишинев, Республика Молдова
e-mail:vtsapkov@gmail.com
[2]Молдавский государственный университет медицины и фармации им. Н. Тестемицану, Кишинев, Молдавия

Производные аминокислот обладают широким набором донорных атомов и образуют с ионами металлов разнообразные по составу и свойствам координационные соединения. Строение и физико-химические характеристики этих веществ определяются одновременным присутствием в их составе соответствующего центрального атома и его внутрисферного окружения. Однако, поскольку при синтезе комплексов в качестве исходных веществ в основном использовались салициловый альдегид и глицин, то представляло интерес выяснить как повлияет на состав, строение и свойства этих соединений введение в состав продуктов конденсации различных заместителей и такого амина как имидазол.

В связи с этим целью настоящей работы является нахождение условий синтеза, установление строения, изучение физико-химических и противомикробных свойств внутрикомплексных соединений меди(II) содержащих имидазол (Im) и продукты конденсации (H_2L^{1-9}) глицина, аланина и фенилаланина с салициловым (HL^1, H_2L^7, H_2L^8), 5-бром-(H_2L^2), 5-нитро-(H_2L^3), 2-гидрокси-1-нафтойным (HL^9) альдегидами и 2,5-(HL^4), 2,4-(HL^5), 2,3-(HL^6) дигидрокси-бензальдегидами.



H_2L^1 : $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = H$; H_2L^2 : $R^1 = Br$, $R^2 = R^3 = R^4 = H$; H_2L^3 : $R^1 = NO_2$, $R^2 = R^3 = R^4 = H$; H_2L^4 : $R^1 = OH$, $R^2 = R^3 = R^4 = H$; H_2L^5 : $R^1 = R^3 = R^4 = H$; $R^2 = OH$; H_2L^6 : $R^1 = R^2 = R^4 = H$, $R^3 = OH$; H_2L^7 : $R^1 = R^2 = R^3 = H$, $R^4 = CH_3$; H_2L^8 : $R^1 = R^2 = R^3 = H$, $R^4 = CH_2C_6H_5$.

Эксперимент показал, что при взаимодействии горячих (50-55°) этанольных растворов глицина, аланина и фенилаланина с салициловым альдегидом или его вышеуказанными замещенными, имидазолом (Im) и ацетатом меди, взятых в молярном отношении 1:1:1:1, образуются мелкокристаллические вещества (I-IX), для которых на основании данных элементного анализа предложен состав $Cu(Im)(L^{1-9}) \cdot nH_2O$ [H_2L^{1-9} = H_2L^1(I), H_2L^2(II), H_2L^3(III), H_2L^4(IV), H_2L^5(V), H_2L^6(VI), H_2L^7(VII), H_2L^8(VIII), H_2L^9(IX), n = 0-2]. На основании данных рентгеноструктурного анализа соединения I, магнетохимического, ИК спектроскопического и термогравиметрического исследования остальных веществ установлено, что исследуемые координационные соединения образуют полимерные цепочки с помощью мостиковых карбоксильных групп азометина. В этих комплексах координационным многогранником атома меди является искаженная тетрагональная пирамида, основание которой составляют атомы фенольного и карбоксильного кислородов, а также азометиновые азоты продукта конденсации и имидазола. Атом кислорода карбоксильной группы соседнего косплекса занимает апикальную вершину координационной пирамиды первого центрального атома меди. Азометины H_2L^{1-9} в них ведут себя как дважды депротонированные тридентатные-O,N,O лиганды с мостиковыми карбоксильными группами. Термолиз веществ проходит через стадию полного термического разложения (360-530°C).

Противомикробную активность синтезированных внутрикомплексных соединений изучали ,,in vitro" методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде (мясопептонный бульон, pH = 7,0). Установлено, что кисследуемые вещества, проявляют селективную как бактериостатическую, так и бактерицидную активность. По отношению к грамположительным микроорганизмам (*Staphylococcus aureus,* ATCC 25923 и *Bacillus cereus* ГИСК 8035) она проявилась в диапазоне концентраций 75-300 мкг/мл. Для подавления роста грамотрицательных тест-культур (*Escherichia coli* ATCC 25922*, Shigela sonnei* и *Salmonella abony* ГИСК 03/03*)* исследуемые координационные соединения малоэффективны : их минимальные подавляющие (МПК) и бактерицидные (МБК) концентрации составляют 150-300 мкг/мл. Как показал эксперимент, на МПК и МБК комплексов I-IX основное влияние оказывает природа заместителей (R^{1-4}) в азометинах H_2L^{1-9} и при однотипном составе комплексов изменяется в ряду : $NO_2 > Br$ » OH. Кроме того, замена салицилиденового фрагмента координированного азометина на нафталиденовый приводит к снижению противомикробной активности комплекса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Национального проекта 11.817.08.48A

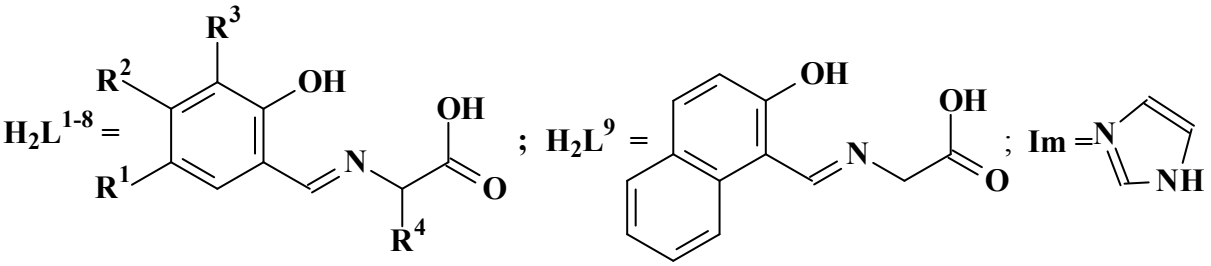
SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COPPER(II) NON-ELECTROLYTE COMPOUNDS CONTAINING IMIDAZOLE AND CONDENSATION PRODUCTS OF α-AMINO ACIDS WITH SALICYLALDEHYDE AND ITS DERIVATIVES

[1]Gulea A.P., [2] Lozan-Tirsu C.S., [1]Tsapkov V.I., [2]Rudic V.F.

[1]Moldova State University, Chisinau, Moldova,
e-mail: vtsapkov@gmail.com
[2]Moldova State University of Medicine and Pharmacy "N. Testemitanu", Chisinau, Moldova

Amino acids derivatives have a wide range of donor atoms and form with metal ions coordination compounds of various composition and properties. The structure and physicochemical properties of these complexes are determined by the nature of the central atom and ligands. However, since mainly salicylaldehyde and glycine were used as initial substances in the complexes synthesis, it was interesting to find out how the introduction of various substituents and such amine as imidazole in the composition of condensation products will affect the composition, structure and properties of these compounds.

The aim of the given work is to find optimum conditions of synthesis, to determine the structure, to study the physicochemical and antimicrobial properties of copper(II) non-electrolyte compounds containing imidazole (Im) and the condensation products (H_2L^{1-9}) of glycine, alanine and phenylalanine with salicylic (HL^1, H_2L^7, H_2L^8), 5-bromo-(H_2L^2), 5-nitro-(H_2L^3), 2-hydroxy-1-naphthoic (HL^9) aldehydes and 2,5-(HL^4), 2,4-(HL^5), 2,3-(HL^6) dihydroxy-benzaldehydes.



H_2L^1 : $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = H$; H_2L^2 : $R^1 = Br$, $R^2 = R^3 = R^4 = H$; H_2L^3 : $R^1 = NO_2$, $R^2 = R^3 = R^4 = H$; H_2L^4 : $R^1 = OH$, $R^2 = R^3 = R^4 = H$; H_2L^5 : $R^1 = R^3 = R^4 = H$; $R^2 = OH$; H_2L^6 : $R^1 = R^2 = R^4 = H$, $R^3 = OH$; H_2L^7 : $R^1 = R^2 = R^3 = H$, $R^4 = CH_3$; H_2L^8 : $R^1 = R^2 = R^3 = H$, $R^4 = CH_2C_6H_5$.

The experiment has shown that by the interaction of hot (50-55°) ethanolic solutions of glycine, alanine and phenylalanine with salicylaldehyde or its substitutents mentioned above, imidazole (Im) and copper acetate, taken in the molar ratio of 1:1:1:1, microcrystalline substances are obtained (I-IX). By means of the elemental analysis data the following composition has been proposed for these substances: $Cu(Im)(L^{1-9}) \cdot nH_2O$ [$H_2L^{1-9} = H_2L^1$(I), H_2L^2(II), H_2L^3(III), H_2L^4(IV), H_2L^5(V), H_2L^6(VI), H_2L^7(VII), H_2L^8(VIII), H_2L^9(IX), n = 0-2]. By means of the data of X-ray analysis of the compound I, magnetochemical, IR spectroscopic and thermogravimetric study of the other substances it has been established that the synthesized coordination compounds form polymer chains with the help of the bridging azomethine carboxyl groups. In these complexes the coordination polyhedron of the copper atom is a distorted tetragonal pyramid. Its base is formed by the phenolic and carboxylic oxygen atoms and also by the azomethinic nitrogen of the condensation product and imidazole. The oxygen atom of the carboxyl group of the neighbouring complex occupies the apical vertex of the coordination pyramid of the first copper central atom. The azomethines H_2L^{1-9} behave as double deprotonated O,N,O tridentate ligands with bridging carboxyl groups. The thermolysis of the complexes occurs through the stage of complete thermal decomposition (360-530°C).

The antimicrobial activity has been studied "in vitro" under liquid nutritive environment (peptonate bullion, pH = 7.0) by means of successive dilutions method. It has been established that the synthesized compounds display selective bacteriostatic and bactericide activity. The antimicrobial activity towards Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus,* ATCC 25923 and *Bacillus cereus* ГИСК 8035) is displayed in the concentration range 75-300 μg/mL. The investigated coordination compounds are less effective for the proliferation of Gram-negative test cultures (*Escherichia coli* ATCC 25922*, Shigela sonnei* and *Salmonella abony* ГИСК 03/03*)*: their minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericide concentration (MBC) are displayed in the concentration range 150-300 μg/mL. The experiment has shown that MIC and MBC of the compounds I-IX are influenced by the substituents nature (R^{1-4}) in the azomethines H_2L^{1-9} and change as follows: $NO_2 > Br$ » OH. In addition, the replacement of the salicylaldehyde with the naphtalydene fragment in the coordinated azomethine reduces the antimicrobial activity of the complex.

This research was supported by the National Project 11.817.08.48A

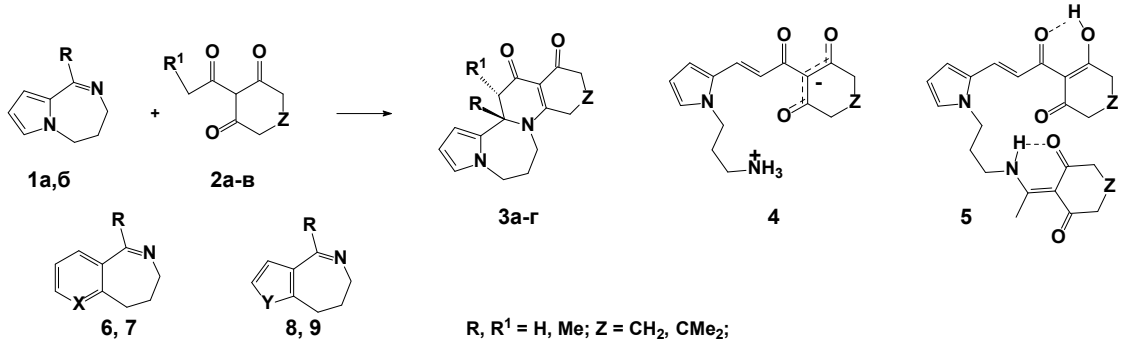
СИНТЕЗ ПИРРОЛО[2',1':3,4][1,4]ДИАЗЕПИНО[1,2-*a*]ХИНОЛИН-1,14-ДИОНОВ АННЕЛИРОВАНИЕМ ПИРРОЛО[1,2-*a*][1,4]ДИАЗЕПИНОВ 2-АЦИЛЦИКЛОГЕКСАН-1,3-ДИОНАМИ

[1]Гулякевич О.В., [2]Курман П.В., [1]Михальчук А.Л., [2]Чернова Т.А.

[1]ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
e-mail: lipmal@iboch.bas-net.by
[2]ГУ «НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
e-mail: pharmcenter@it.org.by

Интерес к конденсированным производным 1,4-диазепинов обусловлен широким спектром их биологической активности. Представители этого ряда проявляют антиоксидантные, антиспазмолитические, антигистаминные, антиконвульсантные, нейропротекторные свойства, выступают агонистами серотонина, антагонистам глутаминовых рецепторов. Однако основное внимание к этим соединениям обусловлено их нейро- и психофоармакологическими свойствами [1-7]. Столь широкий фармакологический потенциал этих азотистых гетероциклов привлекает повышенное внимание к изучению и разработкам методов их синтеза и трансформаций. Очевидно, что усилия, затрачиваемые на исследования в этой и смежных областях химии азотистых гетероциклов будут заведомо плодотворными.

Сферой наших научных интересов являются подходы к синтезу азангулярных гетероциклов аннелированием Шиффовых оснований β-ди-, β,β′-трикарбонильными соединениями (β-ди-, β,β′-триКС) [8, 9]. В рамках проводимых исследований нами изучена циклоконденсация пирроло[1,2-*a*][1,4]диазепинов **1а,б** 2-ацетилциклогексан-1,3-дионами **2а-в,** в результате которой получены 2,3,4,7,8,12b,13,14-октагидро-1*H*,6*H*-пирроло[2',1':3,4][1,4]диазепино[1,2-*a*]хинолин-1,14-дионы **3а-г** и определены их физико-химические характеристики. Выходы целевых пирроло[2',1':3,4][1,4]диазепино[1,2-*a*]хинолин-1,14-дионов **3а-г** достигают 60-75%, что свидетельствует о препаративности метода. Аннелирование осуществляется стереоселективно приводя к смеси *транс*-диастереомеров **3.**



В изученной циклоконденсации как правило образуются побочные 2-(*E*)-3-[1-(3-аммониопропил)-1*H*-2-пирролил]-2-пропеноил-3-оксо-1-циклогексеноляты-1 **4** (до 4-6%) и 2-[1-(3-{2-[(*E*)-3-(2-гидрокси-6-оксо-1-циклогексенил)-3-оксо-1-пропенил]-1*H*-1-пирролил}пропиламино)этилиден]-1,3-циклогександионы **5** (до 1-3%), являющиеся результатом гидролитической лабильности семичленных азометинов в условиях реакций и осуществления побочных конденсаций с 2-ацетилциклогексан-1,3-дионами **2а-в**.

В рамках представленного подхода могут быть получены как ближайшие гомологи пирроло[2',1':3,4][1,4]диазепино[1,2-*a*]хинолин-1,14-дионов **3а-г** по циклу **D**, например октагидро-1*H*-циклопента[2,3][1,4]диазепино[7,1-*a*]изохинолин-1,12-дионы (**3**, Z = связь) или декагидро-1*H*-циклогепта[2,3][1,4]диазепино[7,1-*a*]изохинолин-1,14-дионы (**3**, Z = CH_2CH_2), так и новые конденсированные производные при распространении реакции на 4,5-дигидро-3*H*-2-бензазепины **6** (X = CH_2), 8,9-дигидро-7*H*-пиридо[3,2-*c*]азепины **7** (X = N), 7,8-дигидро-6*H*-фуро[3,2-*c*]азепины 8 (X = O), 7,8-дигидро-6*H*-тиено[3,2-*c*]азепины **9** (X = S), представляющие интерес в поиске новых биологически активных агентов.

Литература:

1. *Horvath E., Horvath K., Hamori T., Fekete S., Solyom S., Palkovits M.* - Progres in Neurobiology, 2000, v. 60, p. 309-342.
2. *De Sarro A., De Sarro G., Gitto R., Grasso S., Micale N., Zappala M.* - Il Farmaco, 1999, v. 54, p. 178-187.
3. De Sarro G., Gitto R., Zappala M., Chimirri A. - Il Farmaco, 2002, v. 57, p. 129-134.
4. *Chimirri A., Gitto R.,Quartarone S., Orlando V., De Sarro A., De Sarro G.* - Il Farmaco, 2002, v. 57, p. 759-763.
5. *Chimirri A., De Sarro G., De Sarro A., Gitto R.,Quartarone S., Zappala M., Constanti A., Libri V.* - J. Med. Chem., 1998, v. 41, № 18, p. 3409-3416.
6. *Zappala M., Gitto R., Bevacqua F., Quartarone S., Chimirri A., Rizzo M., De Sarro G., De Sarro A.* - J. Med. Chem., 2000, v. 43, № 25, p. 4834-4839.
7. *Gitto R., Barreca M. L, De Luca L, De Sarro G., Ferreri G., Quartarone S., Russo E., Constanti A., Chimirri A.* - J. Med. Chem., 2003, v. 46, № 1, p. 197-200.
8. *Akhrem A.A., Gulyakevich O.V., Mikhal'chuk A.L.* - in book: Nitrogen-Containing Heterocycles And Alkaloids. Ed. by V.G. Kartsev, and G.A. Tolstikov, Moscow: Iridium Press, 2001, v. 1, p. 19-32.
9. *Akhrem A.A., Gulyakevich O.V., Mikhal'chuk A.L.* - in book: Nitrogen-Containing Heterocycles. Ed. by V.G. Kartsev Moscow: ICSPF, 2006, v. 1, p. 15-19.

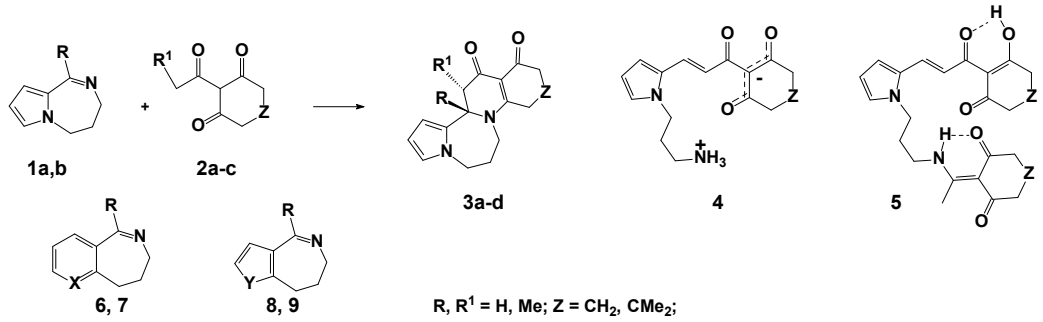
PYRROLO[2',1':3,4][1,4]DIAZEPINO[1,2-*a*]QUINOLINE-1,14-DIONES SYNTHESIS BY THE ANNELATION OF PYRROLO[1,2-*a*][1,4]DIAZEPINES WITH 2-ACYLCYCLOHEXANE-1,3-DIONES

[1]Gulyakevich O.V., [1]Mikhal'chuk A.L., [2]Чернова Т.А.

[1]PSI «Institute of bioorganic chemistry NAS of Belarus», Minsk, Belorussia
e-mail: lipmal@iboch.bas-net.by
[2]PI «SPC «Institute of pharmacology and biochemistry NAS of Belarus»», Minsk, Belorussia
e-mail: pharmcenter@it.org.by

Interest in condensed derivatives of 1,4-diazepines due to a wide spectrum of biological activity. Representatives of this series manifest antioxidant, antispasmodic, antihistamine, anticonvulsant, neuroprotective properties, are the serotonin agonists, antagonists of glutamine receptors. However the basic attentions to these compounds are determined their neuro- and psychopharmacological properties [1-7]. Such a broad pharmacological potential of these nitrogen heterocycles attracted increased attention to research and develop methods for their synthesis and transformations. Obviously, that the efforts spent for researches in these and contiguous areas of chemistry of nitrogenous heterocycles will be obviously fruitful.

Scope of our research interests are the approaches to the synthesis of an azangulyar heterocycles by the annelation of Schiff base with β-di-, β, β'-tricarbonyl compounds (β-di-, β, β'-TriCC) [8, 9]. As part of the research we studied the cyclocondensation pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepines **1a,b** with 2-acetylcyclohaxane-1,3-diones **2a-c**, as a result of which received 2,3,4,7,8,12b,13,14-octahydro-1*H*,6*H*-pyrrolo[2',1':3,4][1,4]diazepin[1,2-a]quinoline-1,14-diones **3a-d** and determined their physical and chemical characteristics. Outputs targets pyrrolo[2',1':3,4][1,4]diazepin[1,2-a]quinoline-1,14-diones **3a-d** reach 60-75%, indicating that the preparative method. Annelation performed stereoselectively leads to a mixture of *trans*-diastereomers **3**.



In studied cyclocondensation as a rule are formed side 2-(*E*)-3-[1-(3-ammoniopropil)-1*H*-2-pyrrolyl]-2-propenoil-3-oxo-1-cyclohexenolyaty-1 **4** (up to 4-6 %) and 2-[1-(3-{2-[(*E*)-3-(2-hydroxy-6-oxo-1-cyclohexenyl)-3-oxo-1-propenyl]-1*H*-1-pirrolil}propilamino)ethylidene]-1,3-cyclohexanedione **5** (1-3%) resulting from the hydrolytic lability of the seven-membered azomethine in the reactions conditions and realizations collateral condensation with 2-acetylcyclohexane-1,3-diones **2a-c**.

In the network of the presented approach can be obtained as the next homologues pyrrolo[2',1':3,4][1,4]diazepin[1,2-*a*]quinoline-1,14-diones 3a-d on the cycle D, for example octahydro-1H-cyclopenta [2,3] [1,4] diazepin [7,1-*a*] isoquinoline-1,12-diones (**3**, Z = bond), or decahydro-1*H*-cyclohepta[2,3][1,4]diazepin[7,1-*a*]isoquinoline-1,14-diones (**3**, Z = CH_2CH_2), and a new condensed derivatives at the propagation reactions of 4,5-dihydro-3H-2-benzazepine **6** (X = CH_2), 8,9-dihydro-7*H*-pyrido [3,2-*c*] azepin **7** (X = N), 7,8-dihydro-6*H*-furo[3,2-*c*]azepine **8** (X = O), 7,8-dihydro-6*H*-thieno[3,2-*c*]azepine **9** (X = S) are of interest in finding new bioactive agents.

References:

1. *Horvath E., Horvath K., Hamori T., Fekete S., Solyom S., Palkovits M.* - Progres in Neurobiology, 2000, v. 60, p. 309-342.
2. *De Sarro A., De Sarro G., Gitto R., Grasso S., Micale N., Zappala M.* - Il Farmaco, 1999, v. 54, p. 178-187.
3. *De Sarro G., Gitto R., Zappala M., Chimirri A.* - Il Farmaco, 2002, v. 57, p. 129-134.
4. *Chimirri A., Gitto R.,Quartarone S., Orlando V., De Sarro A., De Sarro G.* - Il Farmaco, 2002, v. 57, p. 759-763.
5. *Chimirri A., De Sarro G., De Sarro A., Gitto R.,Quartarone S., Zappala M., Constanti A., Libri V.* - J. Med. Chem., 1998, v. 41, № 18, p. 3409-3416.
6. *Zappala M., Gitto R., Bevacqua F., Quartarone S., Chimirri A., Rizzo M., De Sarro G., De Sarro A.* - J. Med. Chem., 2000, v. 43, № 25, p. 4834-4839.
7. *Gitto R., Barreca M. L, De Luca L, De Sarro G., Ferreri G., Quartarone S., Russo E., Constanti A., Chimirri A.* - J. Med. Chem., 2003, v. 46, № 1, p. 197-200.
8. *Akhrem A.A., Gulyakevich O.V., Mikhal'chuk A.L.* - in book: Nitrogen-Containing Heterocycles And Alkaloids. Ed. by V.G. Kartsev, and G.A. Tolstikov, Moscow: Iridium Press, 2001, v. 1, p. 19-32.
9. *Akhrem A.A., Gulyakevich O.V., Mikhal'chuk A.L.* - in book: Nitrogen-Containing Heterocycles. Ed. by V.G. Kartsev Moscow: ICSPF, 2006, v. 1, p. 15-19.

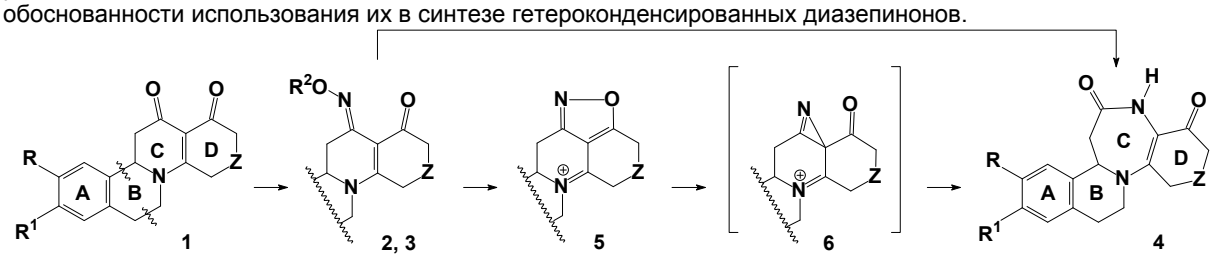
БЕНЗО[2,3][1,4]ДИАЗЕПИНО[7,1-*a*]ИЗОХИНОЛИН-1,13-ДИОНЫ: СИНТЕЗ И СВОЙСТВА

[1]Гулякевич О.В., [1]Михальчук А.Л., [2]Чернова Т.А.

[1]ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
e-mail: lipmal@iboch.bas-net.by
[2]ГУ «НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
e-mail: pharmcenter@it.org.by

Интерес к синтезу гетероконденсированных производных диазепинов обусловлен широким спектром их биологической активности, в частности их нейрогенностью [1, 2]. В ряду бензодиазепинов обнаружены производные, обладающие седативным, гипнотическим, антиконвульсантным, психостимулирующим, нейропротекторным, дофаминергическим, антигистаминным, анксиолитическим действием. Фармакологические данные свидетельствуют, что гетероконденсированные производные диазепинов проявляют более высокую антиконвульсивную активность в сравнении с неконденсированными аналогами [3, 4]. В связи с этим все более пристальное внимание уделяется синтезу диазепинов, конденсированных с гетероциклическими фрагментами для получения биологически активных соединений с более выраженными фармакологическими свойствами [5, 6].

Целью настоящего исследования являлась разработка подходов к синтезу гетероконденсированных производных 1,4-диазепинов из доступных октагидро-1*H*-изохино[2,1-*a*]хинолин-1,13-дионов **1** и их 13-оксиминопроизводных **2** (R^2 = H) [7–9]. Перегруппировка Бекмана оксимов алициклических или гетероциклических кетонов и, в частности, циклогексанонов или пиперидонов-4 является классическим примером формирования семичленных лактамных циклов — азепинонового и диазепинонового соответственно. Однако данных по использованию енаминонов в этих целях не известно, а оксиминопроизводные γ-пиридонов труднодоступны. К тому же полученные нами оксимы **2** в кислых условиях стабильны, в связи с чем высказывались сомнения относительно перспективности и обоснованности использования их в синтезе гетероконденсированных диазепинонов.



R, R^1 = H, OMe; R^2 = H, Me-4-$C_6H_4SO_2$; Z = CH_2, CMe_2

Используя метод расщепления тозилатов **3** (R = Me-4-$C_6H_4SO_2$) в основных условиях нами получены производные, которым на основании результатов физико-химических данных приписано строение бензо[2,3][1,4]диазепино[7,1-*a*]изохинолин-1,13-дионов **4**. Более тщательное исследование этой реакции показало, что она осуществляется через промежуточные изохино[2,1-*a*]изоксазол[3,4,5-*de*]хинолиниевые производные **5**, которые в отдельных экспериментах были выделены и охарактеризованы. В качестве последующих интермедиатов этой реакции постулируются октагидроазирено[2,3-*d*]изохино[2,1-*a*]хинолиниевые производные **6**. Такое отнесение согласуется с существующими представлениями о механизме перегруппировки Бекмана. Выходы бензо[2,3][1,4]диазепино[7,1-*a*]изохинолин-1,13-дионов **4** достигают 70-95%, что свидетельствует о препаративности метода и с учетом доступности изохино[2,1-*a*]хинолин-1,13-дионов **1** (Z = CH_2, CMe_2) и их гомологов по циклу **D** – октагидроциклопента[5,6]пиридо[2,1-*a*]изохинолин-1,12-дионов **1** (Z = связь) и декагидроциклогепта[5,6]пиридо[2,1-*a*]изохинолн-1,14-дионов **1** (Z = CH2CH2) — открывает подход к синтезу октагидро-1*H*-циклопента[2,3][1,4]диазепино[7,1-*a*]изохинолин-1,12-дионов **4** (Z = связь) и декагидро-1*H*-циклогепта[2,3][1,4]диазепино[7,1-*a*]изохинолин-1,14-дионов **4** (Z = CH_2CH_2), также представляющих интерес в поиске новых биологически активных агентов для медицины и медико-биологических исследований.

Литература:

1. *Horvath E.J., Horvath K., Hamori T., [et al.]* - Progress in Neurobiology, 2000, v. 60, p. 309.
2. *Szenazi G., Harsing L.G.* - Drug Discovery Today. Therapeutic Strategies, 2004, v. 1, № 1, p. 69−76.
3. *Gitto R., Orlando V., Quartarone S., [et al.]* - J. Med. Chem., 2003, v. 46, p. 3758–3761.
4. *Chimirri A., Gitto R., Quartarone S., [et al.]* - Il Farmaco, 2002, v. 57, p. 759–763.
5. *Zang P., Zang N., Buckwold V. E., [et al.]* - Bioorg. and Med. Chem., 2007, V. 15, iss. 14, p. 4933−4945.
6. *Movikov M.S., Amer A.A., Khlebnikev A.F.* - Tetrahedron Lett., 2006, v. 47, iss. 5, p. 639−642.
7. *Гулякевич О.В., Михальчук А.Л., Веренич А.И., Рубинов Д.Б., Зенюк А.А., Ахрем А.А.* в кн. Енамины в органическом синтезе: [Сб. науч. трудов]. Под ред. В.С. Шкляева. Екатеринбург: УрО РАН, 1996, с. 111-132.
8. *Akhrem A.A., Gulyakevich O.V., Mikhal'chuk A.L.* - in book: Nitrogen-Containing Heterocycles And Alkaloids. Ed. by V.G. Kartsev, and G.A. Tolstikov, Moscow: Iridium Press, 2001, v. 1, p. 19-32.
9. *Akhrem A.A., Gulyakevich O.V., Mikhal'chuk A.L.* - in book: Nitrogen-Containing Heterocycles. Ed. by V.G. Kartsev, Moscow: ICSPF, 2006, v. 1, p. 15-19.

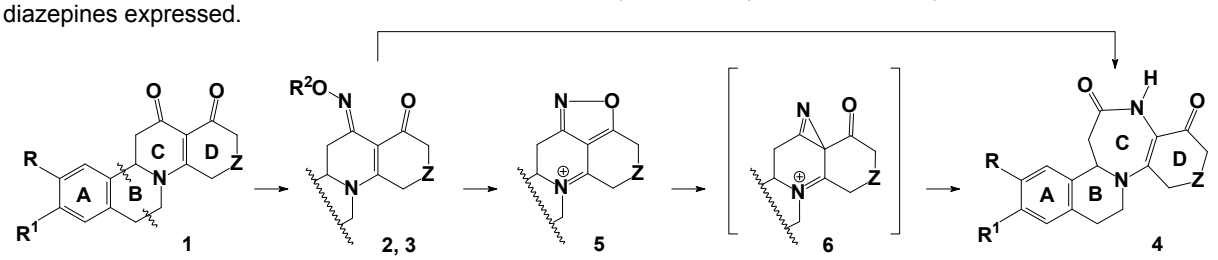
BENZO[2,3][1,4]DIAZEPINO[7,1-*a*]ISOQUINOLINE-1,13-DIONES: SYNTHESIS AND PROPERTIES

[1]Gulyakevich O.V., [1]Mikhal'chuk A.L., [2]Чернова Т.А.

[1]PSI «Institute of bioorganic chemistry NAS of Belarus», Minsk, Belorussia
e-mail: lipmal@iboch.bas-net.by
[2]PI «SPC «Institute of pharmacology and biochemistry NAS of Belarus»», Minsk, Belorussia
e-mail: pharmcenter@it.org.by

Interest to synthesis of the heterocondensed diazepine derivatives is caused by a wide spectrum of their biological activity, in particular them neurogenous [1, 2]. In a series of benzodiazepine derivatives were found, has sedative, hypnotic, antikonvulsantnym, psychoactive, neuroprotective, dopaminergic, antihistamine,anxiolytic effects. Pharmacological data testify, that heterocondensed diazepine derivatives manifest higher anticonvulsive activity in comparison with not condensed analogues [3, 4]. In this connection more and more steadfast attention is given to synthesis diazepines, condensed with heterocyclic fragments for reception bio-effector with more expressed properties [5, 6].

The purpose of the present research consisted in working out of approaches to synthesis of the heterocondensed 1,4-diazepine derivatives from accessible octahydro-1*H*-isoquino[2,1-*a*]quinoline-1,13-diones **1** and them 13- oximino derivatives **2** (R^2 = H) [7-9]. Beckmann rearrangement of oximes of alicyclic or heterocyclic ketone and in particular cyclohexanones or piridones-4 is a classical instance of formation seven-membered lactam cycles – azepine and diazepine, accordingly. However, data on the use enaminones for these purposes is not known, but oximino γ-piridon derivatives is difficult to access. Besides, received by us oximes **2** in acidic conditions are stable, therefore a doubts about the viability and validity of their use in synthesis heterocondensed diazepines expressed.



R, R^1 = H, OMe; R^2 = H, Me-4-$C_6H_4SO_2$; Z = CH_2, CMe_2

Using a method of tosylates splitting **3** (R = Me-4-$C_6H_4SO_2$) in the basic conditions by us was received the derivatives to which on the basis of results of physical and chemical researches has been attributed the structure 1,2,3,4,6,7,11b,12,13,14-decahydrobenzo[2,3][1,4]diazepino[7,1-*a*]isoquinoline-1,13-diones **4**. Subsequent more careful research of this reaction has shown, that it is carried out through intermediate isoquino[2,1-*a*]isoxazolo[3,4,5-*de*]quinolin-13-ium derivatives **5** which in separate experiments have been isolated out and characterised. In the capacity of the subsequent intermediates this reaction by us are postulated octahydroazireno[2,3-*d*]isoquino[2,1-*a*]quinolin-13-ium derivatives **6**. This assignment is consistent with existing ideas about the mechanism of Beckmann rearrangement Yields of benzo[2,3][1,4]diazepin[7,1-*a*]isoquinoline-1,13-diones **4** reaches 70-95%, indicating a preparative method and taking into account the accessibility isoquino[2,1-*a*]quinoline-1,13-diones **1** (Z = CH_2, CMe_2) and their homologues on the cycle **D** — octahydro cyclopenta[5,6] pyrido[2,1-*a*]isoquinoline-1,12-diones **1** (Z = bond) and decahydrocyclohepta[5,6]pyrido[2,1-*a*] isoquinoline-1,14-diones **1** (Z = CH_2CH_2) — opens the approach to the synthesis of octahydro-1H-cyclopenta[2,3][1,4]diazepin[7,1-*a*]isoquinoline-1,12-diones **4** (Z = bond) and decahydro-1*H*-cyclohepta[2,3][1,4]diazepin[7,1-*a*]isoquinoline-1,14-diones **4** (Z = CH_2CH_2), is also of interest in finding new biologically active agents for medicine and biomedical research.

References:

1. *Horvath E.J., Horvath K., Hamori T., [et al.]* - Progress in Neurobiology, 2000, v. 60, p. 309.
2. *Szenazi G., Harsing L.G.* - Drug Discovery Today. Therapeutic Strategies, 2004, v. 1, № 1, p. 69−76.
3. *Gitto R., Orlando V., Quartarone S., [et al.]* - J. Med. Chem., 2003, v. 46, p. 3758–3761.
4. *Chimirri A., Gitto R., Quartarone S., [et al.]* - Il Farmaco, 2002, v. 57, p. 759–763.
5. *Zang P., Zang N., Buckwold V. E., [et al.]* - Bioorg. and Med. Chem., 2007, V. 15, iss. 14, p. 4933−4945.
6. *Movikov M.S., Amer A.A., Khlebnikev A.F.* - Tetrahedron Lett., 2006, v. 47, iss. 5, p. 639−642.
7. *Гулякевич О.В., Михальчук А.Л., Веренич А.И., Рубинов Д.Б., Зенюк А.А., Ахрем А.А.* - in book: Enamines in organic synthesis: Proceedings (in Russian). Ed. by V.S. Shklyaev. Yekaterinburg: Ural branch of RAS, 1996, p. 111-132.
8. *Akhrem A.A., Gulyakevich O.V., Mikhal'chuk A.L.* - in book: Nitrogen-Containing Heterocycles And Alkaloids. Ed. by V.G. Kartsev, and G.A. Tolstikov, Moscow: Iridium Press, 2001, v. 1, p. 19-32.
9. *Akhrem A.A., Gulyakevich O.V., Mikhal'chuk A.L.* - in book: Nitrogen-Containing Heterocycles. Ed. by V.G. Kartsev, Moscow: ICSPF, 2006, v. 1, p. 15-19.

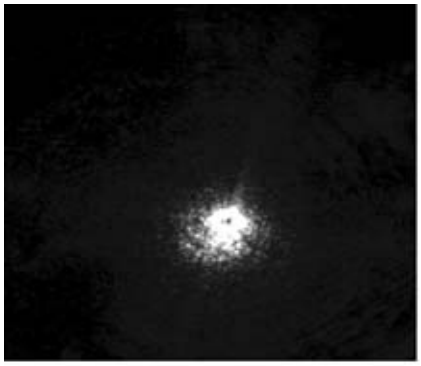
ИССЛЕДОВАНИЕ ОПТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ ВОДНИХ РАСТВОРОВ НАНОЧАСТИЦ SiO_2 ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Давиденко Н.А., Радченко Е.А., Голуб А.А.

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

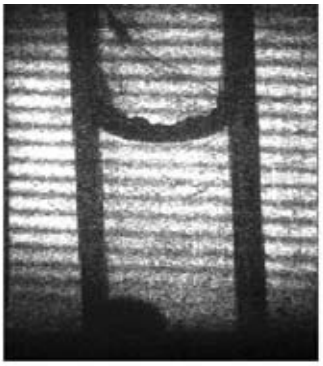
Наноразмерные модификации оксида кремния, за счет развитой поверхности и большого разнообразия путей ее модификации, являются перспективными основами для создания биологически активных композитов. Так в предыдущих работах [1] продемонстрирована противораковая эффективность композита SiO_2 с иммобилизированным фуллереном C_{60}. Однако для изучения механизмов воздействия композитов на клетку существует проблема получения и оценки стабильного водного раствора соответствующих частичек наноразмера.

В работе продемонстрирована возможность использования различных оптических методов для выявления наличия и оценки концентрации частиц на основе наноразмерных модификаций SiO_2 в водных растворах. Использованы методы: 1) сравнения светорассеяния сфокусированного лазерного луча, прошедшего через кювету с H_2O без добавок частиц и после их введения в жидкость соответственно (рис. 1,а и рис. 1,б); 2) наблюдение процесса электрофореза в кювете с H_2O без добавок частиц и после их введения соответственно (рис. 2,а и рис. 2,б); 3) голографический метод наблюдения изменения интерференционных полос для кюветы с H_2O без добавок частиц и после их введения соответственно (рис. 3,а и рис. 3,б). Обнаружено, что при использовании всех 3-х методов есть возможным обнаружить наличие частиц, причем увеличение их концентрации сопровождается интенсификацией изменений оптического изображения.

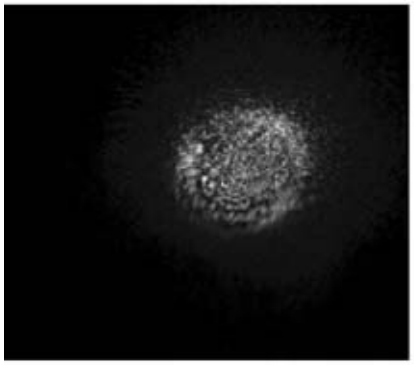


1, а

2, а



3, а



1, б

2, б

3, б

Предполагается, что при использовании соответствующего математического аппарата обработки изображений рассматриваемые оптические методы могут быть использованы для быстрого экспес-анализа растворов биологически активных веществ наноразмера.

Работа выполнена при финансовой поддержке УНТЦ (проект № 5214)

Литература:

1. *Dvorshchenko O.S., Didenko G.V., Potebnya M.G., Kuzmenko O.P., Pavluchenko N.V., Golub O.A.* // Influence of nanocomposites of fulleren C60 on anticancer immunity - IX International conference of young oncologist "Current problems of experimental and clinical oncology", Kiev 2008. P. 48.

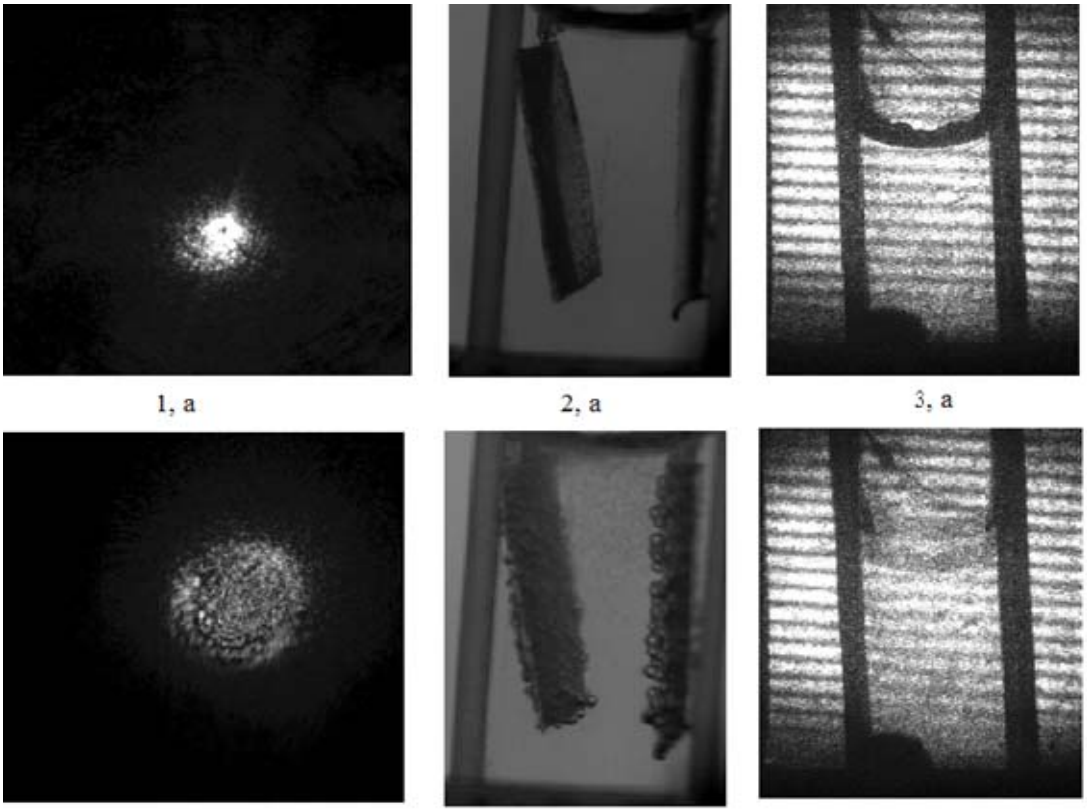
OPTICAL INVESTIGATION OF SILICA NANOPARTICLES WATER SOLUTION FOR BIOLOGICAL OPLICATION

Davidenko N.A., Radchenko E.A., Golub A.A.

Kiev National Taras Shevchenko University, Kiev, Ukraine
e-mail: agolub@univ.kiev.ua

Due to a large surface area and easy ways of surface modification nanosized silica particles are perspective base for biologically active composites. It was shown [1] that composite where fullerene C_{60} immobilized on silica particle is stimulating the immune system against cancer cells. But there is a problem to investigate a water suspension of nanocomposites. The size, charge and concentration of nanoparticles solution is very important for understanding and investigation of there bioactivity.

The concentration of silica based nanoparticles in water solutions can be identified and evaluated by different optical techniques. The methods which were used: 1) the comparison of light scattering of focused laser beam on water (pic 1 a) and nanoparticle solution (pic 1 b); 2) the electrophoresis process in water (pic. 2 a) and nanoparticle solution (pic 2 b); 3) holographic method of observing changes in the fringe for water (pic. 3 a) and nanoparticle solution (pic 3 b). It is shown that all listed methods can detect nanoparticles and have a response on concentration increase.



1, а 2, а 3, а

1, б 2, б 3, б

It is suggested that viewed optical techniques with appropriate mathematical tools for image processing can be used as an express test methods for nanoparticle solution.

We are grateful for financial support from STCU (project № 5214)

References:

1. *Dvorshchenko O.S., Didenko G.V., Potebnya M.G., Kuzmenko O.P., Pavluchenko N.V., Golub O.A. //* Influence of nanocomposites of fulleren C60 on anticancer immunity - IX International conference of young oncologist "Current problems of experimental and clinical oncology", Kiev 2008. P. 48.

СИНТЕЗ И ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ АНТИАРИТМИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НИБЕНТАН

Давыдова Н.К.

Учреждение Российской академии наук Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия
e-mail: davydova@ineos.ac.ru

В последние десятилетия основной причиной инвалидности и смертности во всем мире являются сердечно-сосудистые заболевания, в числе которых лидирующее место занимают аритмии.

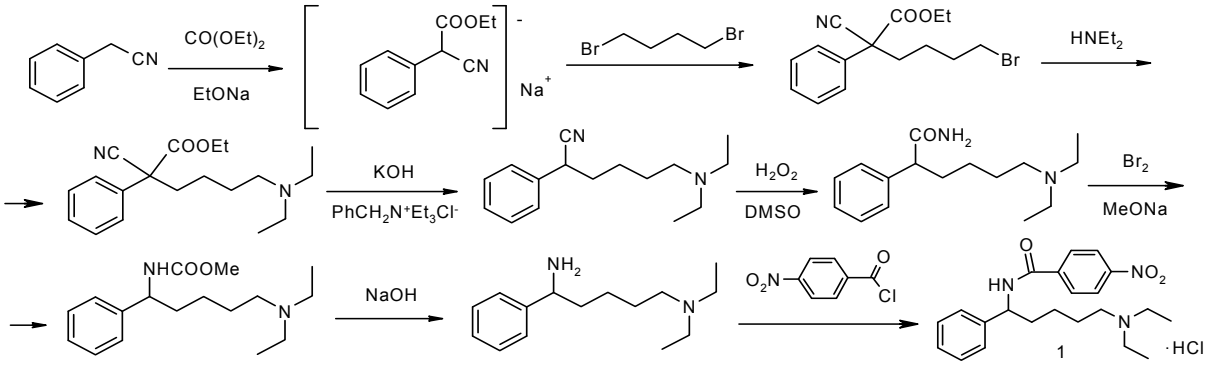
Наиболее распространенным видом нарушений ритма сердца является мерцательная аритмия (МА). Она включает в себя два вида предсердных аритмий: мерцание (фибрилляция) предсердий и трепетание предсердий. Мерцание предсердий может быть постоянным или возникать периодически. При этом больные ощущают сердцебиение, «трепетание сердца», перебои в сердце. Известно, что сегодня для лечения МА используют препараты, относящиеся к третьему классу антиаритмических средств.

Антиаритмические препараты (ААП) III класса - блокаторы калиевых каналов. К ним относятся амиодарон, соталол, нибентан.

Все ААП отличаются плохой переносимостью и в той или иной степени оказывают аритмогенное действие. Поэтому лечение аритмии и особенно МА, даже с учетом опыта, накопленного клинической медициной, остается сложной задачей. В связи с этим поиск и создание новых высокоэффективных антиаритмических препаратов является весьма актуальным.

Российские ученые создали новый ААП III класса НИБЕНТАН, разработали способ получения действующего вещества нибентана - гидрохлорида N-[5-(диэтиамино)- 1-фенилпентил]-4-нитробензамида и внедрили его в производство.

Синтез гидрохлорида N-[5-(диэтиамино)-1-фенилпентил]-4-нитробензамида (1) базируется на отечественном сырье и осуществляется по следующей схеме [1,2]:



Нибентан не имеет эффектов β-блокатора и поэтому, в отличие от амиодарона и соталола, не оказывает значимого влияния на частоту синусового ритма и длительность интервала P—Q. Этот препарат существует только в форме для внутривенного введения и является высокоэффективным средством купирования наджелудочковых тахиаритмий.

Нибентан назначают при пароксизмальной суправентрикулярной тахикардии, пароксизмальной и постоянной форме мерцания и трепетания предсердий. Применение нибентана противопоказано больным с брадикардией, удлинением интервала Q-T более 440 мсек, при гипокалиемии, гипомагниемии. Из-за риска аритмогенных эффектов препарат не следует применять у больных с предсердными, желудочковыми экстрасистолиями и пароксизмами неустойчивой желудочковой тахиаритмии, при остром инфаркте миокарда, а также при беременности, кормлении грудью и в детском возрасте. Нибентан выпускается в виде 1% раствора (20 мг/2 мл) в ампулах для внутривенного введения, применяется в палатах интенсивной терапии под мониторным контролем ЭКГ на протяжении 12-24 ч. [3].

Таким образом, российскими учеными был создан и внедрен в производство и медицинскую практику инновационный антиаритмический препарат III класса нибентан, обладающий свойством активно блокировать выход из клеток ионов калия, что позволило увеличить рефрактерность миокарда. Нибентан успешно прошел клинические испытания, показав способность на 86-88% восстанавливать ритм при мерцательной аритмии, и на сегодняшний день является эффективным ААП III класса.

Литература:

1. Патент № 2059612 (Россия). С 07 С 233/80, 231/02. Способы получения гидрохлорида 1-фенил-1-п-нитробензоиламино-5-N,N-диэтиламинопентана и 1-фенил-1-амино-5-N,N-диэтиламинопентана / Глушков Р.Г., Львов А.И., Давыдова Н.К., Сизова О.С.,Санжарова Г.М., Полякова М.Я., Скачилова С.Я., Желтухин Н.К., Черкасова Е.М.
2. *Davydova, N.K., Sizova, O.S., Vinogradova, S.M., L'vov, A.I., Glushkov, R.G., Yuzhakov S.D. et al.* // Synthesis and antifibrillatory activity of nibentan and its analogues. – *Eur. J. Med. Chem.*, 2000, **35**(2), 205-215.
3. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства. - 14-е изд.- М.: ООО «Новая Волна», 2001, том 1, с. 373-374.

SYNTHESIS AND MEDICAL APPLICATION OF A NOVEL ANTIARRHYTHMIC DRUG NIBENTAN

Davydova N.K.

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

In recent decades, cardiovascular diseases, with the leading place occupied by an arrhythmia, became the main cause of disability and death worldwide.

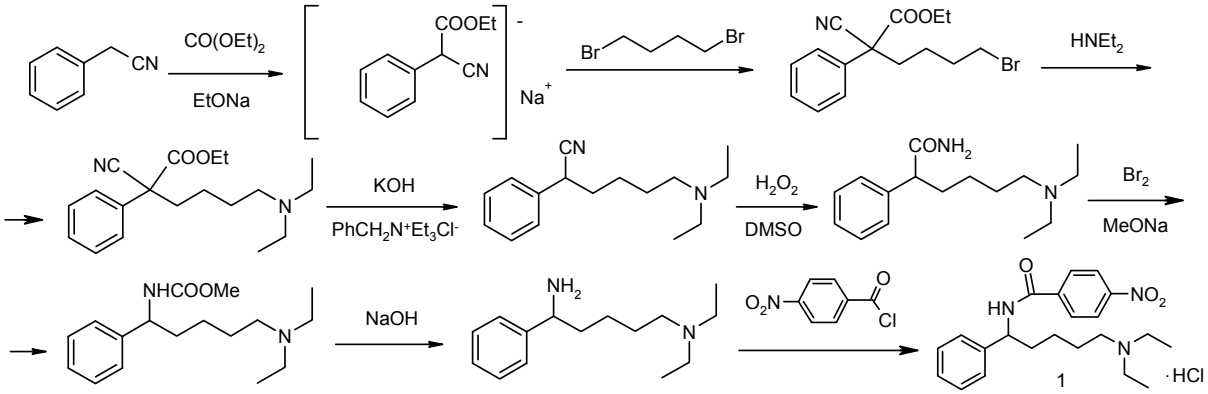
The most common type of arrhythmia is atrial fibrillation (AF). It includes two types of atrial arrhythmias: atrial fibrillation and atrial flutter. Atrial fibrillation can be persistent or occur intermittently. In the latter case, the patients feel palpitations, fluttering of the heart, cuts through the heart. Currently, drugs related to the third class of antiarrhythmics are used for the treatment of atrial fibrillation.

Third class antiarrhythmic drugs are represented by blockers of potassium channels, such as amiodarone, sotalol, nibentan.

All antiarrhythmic drugs are characterized by poor tolerability and by arrhythmogenic effects to some extent. Therefore, treatment of arrhythmias, especially atrial fibrillation, remains a challenge despite all the experience accumulated by clinical medicine. Accordingly, discovery and development of new effective antiarrhythmic drugs becomes an important task.

Russian scientists have created a new class III antiarrhythmic drug NIBENTAN, developed a method for manufacturing of it's active ingredient - N-[5-(diethylamino)-1-phenylpentyl]-4-nitrobenzamide hydrochloride and implemented this method in industrial production.

Synthesis of N-[5-diethylamino)-1-phenylpentyl]-4-nitrobenzamide hydrochloride (1) was performed using solely domestic raw materials and carried out as follows [1, 2]:



Nibentan possesses no β-blocker effect and therefore, in contrast to amiodarone and sotalol, has no significant effect on the incidence of sinus rhythm and the duration of the interval P-Q. This drug exists only in a form for intravenous administration and is highly effective for relief of supraventricular tachyarrhythmias.

Nibentan prescribed for treatment of paroxysmal supraventricular tachycardia, paroxysmal and permanent form of atrial fibrillation and atrial flutter. Nibentan treatment contraindicates in patients with bradycardia, Q-T prolongation over 440 ms, with hypokalaemia and hypomagnesemia. Because of the risk of arrhythmogenic effects, this drug should not be used in patients with atrial, ventricular extrasystoles, and paroxysmal nonsustained ventricular tachyarrhythmias in acute myocardial infarction, as well as during pregnancy, breast-feeding and childhood. Nibentan is produced in a form of 1% solution (20 mg / 2 ml) ampoules for intravenous use in intensive care units under the control of the ECG monitor for 12-24 hours [3].

In conclusion, the Russian scientists developed an innovative class III antiarrhythmic drug nibentan that actively block the exit from the cell of potassium ions thus increasing the refractoriness of the myocardium. The drug was manufactured in industrial settings and efficiently employed in clinics. Clinical trials with nibentan were successful, demonstrating nibentan's ability to restore the rhythm of 86-88% during atrial fibrillation, thus making nibentan an effective class III antiarrhythmic drug.

References:

1. Patent No. 2059612 (Russia). C 07 C 233/80, 231/02. Process for the preparation of 1-phenyl-1-p-nitrobenzoylamino-5-N,N-diethylaminopentane hydrochloride and 1-phenyl-1-amino-5-N,N-diethylaminopentane. / Glushkov, R.G., L'vov, A.I., Davydova, N.K., Sizova, O.S., Sanzharova, G.M., Polyakova, M.Ya., Skachilova, S.Ya., Zheltukhin, N.K., Cherkasova, E.M.
2. *Davydova, N.K., Sizova, O.S., Vinogradova, S.M., L'vov, A.I., Glushkov, R.G., Yuzhakov S.D. et al.* // Synthesis and antifibrillatory activity of nibentan and its analogues. – *Eur. J. Med. Chem.*, 2000, **35**(2), 205-215.
3. *Mashkovskiy M.D.* Drugs. - 14th ed. - Moscow: OOO "Novaya Volna", 2001, vol.1, p. 373-374.

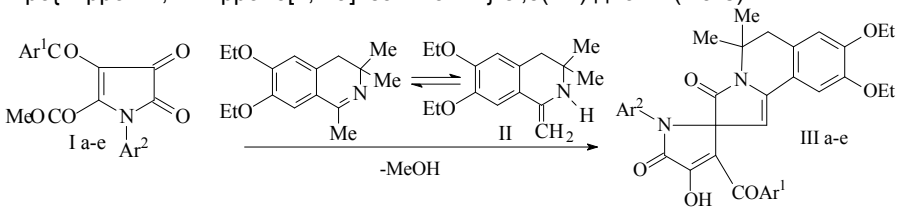
СИНТЕЗ И АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 1-АРИЛ-3-АРОИЛ-4-ГИДРОКСИ-5',5'-ДИМЕТИЛ-8',9'-ДИЭТОКСИ-5',6'-ДИГИДРО-3'*Н*-СПИРО{ПИРРОЛ-2,2'-ПИРРОЛО[2,1-а]ИЗОХИНОЛИН}-3',5(1*Н*)-ДИОНОВ

[1,3]Денисламова Е.С., [2]Шкляев Ю.В., [1]Махмудов Р.Р., [1,3]Масливец А.Н.

[1]Естественнонаучный институт Пермского государственного университета, Пермь, Россия
e-mail: katherin85@rambler.ru
[2]Институт технической химии УрО РАН, Пермь, Россия
[3]Пермский государственный университет, Пермь, Россия

В литературе описаны несколько направлений взаимодействия моноциклических 1*Н*-пиррол-2,3-дионов с циклическими и гетероциклическими енаминокетонами [1,2]. В настоящей работе нами предпринято исследование взаимодействия 1-арил-4-ароил-5-метоксикарбонил-1*Н*-пиррол-2,3-дионов с замещенным 1-метил-3,4-дигидроизохинолином, установление структуры образующихся соединений современными физико-химическими методами, а также изучение анальгетической активности продуктов синтеза.

При взаимодействии 1-арил-4-ароил-5-метоксикарбонил-1*Н*-пиррол-2,3-дионов (Iа-е) с 6,7-диэтокси-1,3,3-триметил-3,4-дигидроизохинолином (II) в соотношении 1:1 при нагревании в среде безводного 1,2-дихлорэтана в течение 30-40 мин образуются 1-арил-3-ароил-4-гидрокси-5',5'-диметил-8',9'-диэтокси-5',6'-дигидро-3'*Н*-спиро{пиррол-2,2'-пирроло[2,1-а]изохинолин}-3',5(1*Н*)-дионы (IIIа-е).



I, III: $Ar^1 = Ar^2$ =Ph (а), $Ar^1 = C_6H_4Me$-4, Ar^2 = Ph (б), $Ar^1 = C_6H_3Me_2$-2,4, $Ar^2 = C_6H_4Me$-4 (в), $Ar^1 = C_6H_4Br$-4, $Ar^2 = C_6H_4Me$-4 (г), Ar^1 = Ph, $Ar^2 = C_6H_4OMe$-4 (д), Ar^1 = Ph, $Ar^2 = C_6H_4Cl$-4 (е)

Соединения (IIIа-е) получаются с высокими выходами и представляют собой бесцветные кристаллические вещества с высокими температурами плавления, плавящиеся с разложением, трудно растворимые в обычных органических растворителях, нерастворимые в воде и алканах. Структура полученных соединений (IIIа-е) подтверждена данными ИК, ПМР спектроскопии.

Анальгетическую активность изучали на беспородных мышах массой 18-22 г по методике «горячая пластинка» [3]. Исследуемые соединения вводили внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг в виде взвеси в 2% крахмальном растворе за 30 мин до помещения животных на нагретую до 53,5 ^oC металлическую пластинку. Показателем анальгетического действия служило увеличение длительности пребывания животного на «горячей пластинке» до наступления оборонительной реакции - облизывания задних лапок. Эффект оценивали через 2,5 ч после введения соединений. В опыте использовались животные с исходным временем наступления оборонительного рефлекса не более 15 с. Каждое соединение испытывали на 6 животных. Препаратами сравнения служили анальгин и ортофен.

Статистическую обработку данных проводили с использованием коэффициента Стьюдента. Эффект считали достоверным при $p \le 0,05$ [4].

№ соединения	Доза, мг/кг	Время оборон. рефл. через 2,5 часа	Коэффициент Стьюдента
IIIа	50, в/б	24,40±2,39	p<0,5
IIIб	50, в/б	19,80±1,88	p<0,01
IIIв	50, в/б	18,58±1,11	p<0,01
IIIг	50, в/б	17,90±2,20	p<0,05
IIIд	50, в/б	17,40±1,92	p<0,1
IIIе	50, в/б	17,10±11,48	p<0,5
Анальгин	93 ($ЕД_{50}$)	16,33±3,02	p<0,1
Ортофен	10($ЕД_{50}$)	26,2±0,96	p<0,01
Контроль(2% крахм. слизь)	-	10,75±1,63	

Выявлено, что соединения (IIIа-е) обладают анальгетическим действием. Среди них наиболее активны соединения (IIIа,б), действующие сильнее анальгина, хотя и уступающие по активности и длительности действия ортофену. По-видимому, введение пара-заместителя в бензольный цикл у атома азота в положении *1* снижает анальгетическую активность соединений (IIIв-е) относительно таковой незамещенных в этом пара-положении соединений (IIIа,б).

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (проект 2.19.10).

Литература:

1. *Ю.Н. Банникова, А.Н. Масливец, З.Г. Алиев.* // Двойная спиро-бис-гетероциклизация метил 1-арил-4-ароил-5-метоксикарбонил-1Н-пиррол-2,3-дионов под действием 3-анилино-5,5-диметилциклогекс-2-ен-1-онов - Ж. орган. химии, 2007, т. 43, с. 1339-1342.
2. *Е.С. Денисламова, А.Н. Масливец.* // Реализация трех направлений взаимодействия метил 1-арил-3-ароил-4,5-диоксо-4,5-дигидро-1Н-пиррол-2-карбоксилатов с N-незамещенным 3-амино-5,5-диметилциклогекс-2-ен-1-оном - Ж. орган. химии, 2010, т. 46, с. 389-394.
3. *N.B. Eddy, D.J. Leimbarh,* Pharmacol and Exper. Gher., 1953, с. 385.
4. *Л. Беленький* Элементы количественной оценки фармакологического эффекта, Медицинская литература, Ленинград 1963.

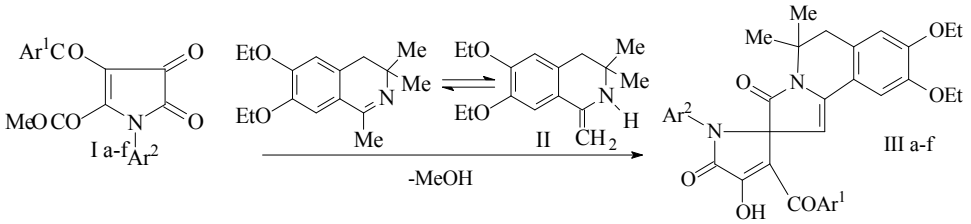
SYNTHESIS AND ANALGESIC ACTIVITY 1-ARYL-3-AROYL-4-HYDROXY-5',5'-DIMETHYL-8',9'-DIETHOXY-5',6'-DIHYDRO-3'H-SPIRO{PYRROLE-2,2'-PYRROLO[2,1-A]ISOQUINOLINE}-3',5(1H)-DIONES

[1,3] Denislamova E.S., [2] Shklyaev Yu.V., [1]Mahmudov R.R., [1,3] Maslivets A.N.

[1]Natural Sciences Institute of Perm State University, Perm, Russia. e-mail: katherin85@rambler.ru
[2]Institute of Technical Chemistry UrD RAS, Perm, Russia
[3]Perm State University, Perm, Russia

In the literature some directions of interaction monocyclic 1H-pyrrol-2,3-diones with cyclic and heterocyclic enaminoketones are described [1,2]. In this study, we investigated the interaction of 1-aryl-4-aroyl-5-methoxycarbonyl-1H-pyrrol-2,3-diones with substituted 1-methyl-3,4-dihydroisoquinoline.

In reaction of 1-aryl-4-aroyl-5-methoxycarbonyl-1H-pyrrol-2,3-diones (Ia-f) with 6,7-diethoxy-1,3,3-trimethyl-3,4-dihydroisoquinoline (II) taken in a ratio 1:1 performed by boiling in anhydrous 1,2-dichloroethane for 30-40 min we obtained 1-aryl-3-aroyl-4-hydroxy-5',5'-dimethyl-8',9'-diethoxy-5',6'-dihydro-3'H-spiro{pyrrole-2,2'-pyrrolo[2,1-a]isoquinoline}-3',5(1H)-diones (IIIa-f).



I, III: $Ar^1 = Ar^2$ =Ph (a), $Ar^1 = C_6H_4Me$-4, Ar^2 = Ph (b), $Ar^1 = C_6H_3Me_2$-2,4, $Ar^2 = C_6H_4Me$-4 (c), $Ar^1 = C_6H_4Br$-4, $Ar^2 = C_6H_4Me$-4 (d), Ar^1 = Ph, $Ar^2 = C_6H_4OMe$-4 (e), Ar^1 = Ph, $Ar^2 = C_6H_4Cl$-4 (f)

Compounds (IIIa-f) are colorless crystalline substances which melt with decomposition at a high temperature; they are readily soluble in DMF and DMSO, poorly soluble in common organic solvents and insoluble in saturated hydrocarbons and water. The structure of synthesized compounds (IIIa-f) was confirmed by IR, NMR spectroscopy.

Analgesic activity was studied on mongrel mice weighing 18-22 g by the method of "hot plate" [3]. Test compounds were administered intraperitoneally at a dose of 50 mg / kg as a suspension in 2% starch solution for 30 min before placing animals on a heated to 53,5 ° C metal plate. Measure of analgesic effect is the increasing length of stay of the animal to a "hot plate" before the onset of defensive reaction - licking hind paws. The effect was evaluated after 2.5 h after administration of the compounds. The experiment used animals from the original time of the onset of defensive reflex, not more than 15 seconds. Each compound was tested on 6 animals. Drugs were compared analgin and ortofen.

Statistical data processing was performed using Student's coefficient. The effect was considered significant at $p \leq 0,05$ [4].

№	Dose, mg / kg	Time defensive reflex through 2.5 h	Student's coefficient
IIIa	50	24,40±2,39	p<0,5
IIIb	50	19,80±1,88	p<0,01
IIIc	50	18,58±1,11	p<0,01
IIId	50	17,90±2,20	p<0,05
IIIe	50	17,40±1,92	p<0,1
IIIf	50	17,10±11,48	p<0,5
Analgin	93 ($ЕД_{50}$)	16,33±3,02	p<0,1
Ortofen	10($ЕД_{50}$)	26,2±0,96	p<0,01
Control (2% starch solution)	-	10,75±1,63	

Revealed that compounds (IIIa-f) have an analgesic effect. Among the most active compounds (IIIa, b) acting more analgin, though inferior in activity and duration of action ortofenu. Apparently, the introduction of the para-substituent in the benzene ring at the nitrogen atom in position 1 reduces the analgesic activity of compounds (IIIc-f) relative to that of unsubstituted in the para-position of compounds (IIIa, b).

The study was carried out under financial support of the Ministry of Education of the Russian Federation (project 2.19.10).

References:

1.*Yu.N. Bannikova, A. N. Maslivets, Z.G. Aliev. Russ.* J. Org. Chem., 2007, vol. 43, p. 1339-1342.
2.*E.S. Denislamova, A. N. Maslivets.* Russ. J. Org. Chem., 2010, vol. 46, p. 389-394.
3.*N.B. Eddy, D.J. Leimbarh,* Pharmacol and Exper. Gher., 1953, c. 385.
4.*L. Belenkiy,* Elements of quantitative evaluation of the pharmacological effect, Medical Literature, Leningrad 1963

ЭКСПРЕСС – ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЙОДА В БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВКАХ МЕТОДОМ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ

[1]Дерябина В.И., [1]Слепченко Г.Б , [1]Фам Кам Ньунг, [1]Хо Ши Линь, [2]Юдина Н.Д.

[1] Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, Россия
e-mail: microlab@tpu.ru
[2] Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства и торфа СО Россельхозакадемии, Томск, Россия
e-mail: dvitomsk@rambler.ru

Один из путей решения проблемы йододефицита – введение в рацион животных кормов, обогащенных соединениями йода.

На базе Сибирского НИИ сельского хозяйства и торфа СО Россельхозакадемии разработаны биологически активные добавки на основе гуминовых препаратов, которые широко используются в виде кормовых добавок или удобрений.

В настоящее время для определения йода и его соединений в различных объектах все чаще используют метод вольтамперометрии (ВА). Методы ВА привлекательны тем, что сочетают высокие информационные возможности с простотой процесса измерения сигнала при невысокой стоимости самого оборудования. Для определения массовой концентрации йода в пищевых продуктах методом ВА принят ГОСТ Р [1].

Нами изучено вольтамперометрическое поведение йодид-ионов на серебряных электродах модифицированных арилдиазоний тозилатами $ArN_2^+OTs^-$ (где Ar = p-$NH_2C_6H_4$, p-$HOOCC_6H_4$, p-$NO_2C_6H_4$). Выбраны основные параметры определения йодид-ионов на органо-модифицированных электродах: время электролиза, потенциал накопления, природа фонового электролита и др. Все электрохимические измерения проведены на анализаторах «СТА» и «СТА - элемент» (ООО «ИТМ», г. Томск).

При сравнении градуировочных зависимостей аналитических сигналов йодид-ионов, полученных на различных типах органно-модифицированных электродах установлено, что максимальный чувствительностью обладает электрод, модифицированный арилдиазоний тозилатом с аминогруппой (МАgЭ – NH_2).

На основании полученных результатов предложен алгоритм методики количественного химического анализа проб БАД на содержание йода, который включает перевод из пробы в раствор всех форм йода в виде йодид-ионов, в нашем случае это щелочное окислительное плавление, с последующим ВА - определением на МАgЭ – NH_2. При этом накопление йодид-ионов в перемешиваемом растворе проводят в течение 10 – 20 с при потенциале электролиза (0,0 ± 0,05)В относительно хлоридсеребряных электродов на фоне 0,1 моль/дм^3 раствора сернокислого гидразина с последующей регистрацией катодных пиков в дифференциально - импульсном режиме съемки вольтамперограмм при скорости развертки потенциала 20 мВ/с. Концентрацию йодид-ионов определяют по высоте пика в диапазоне потенциалов (– 0,4 ± 0,05) В методом добавок аттестованных смесей.

В ходе исследований установлено, что определению йодид-ионов не мешают вещества, присутствие которых возможно в водах, пищевых продуктах, кормах, кормовых добавках, и биологических объектах: Zn, Co, Ni, Pb, Cu, Hg, Fe на уровне предельно допустимой концентрации.

Проверка правильности данной методики проведена методом «введено-найдено», удвоением навески и сравнением с ГОСТ Р. Предел обнаружения составляет 0,03 мг /кг, относительное стандартное отклонение – не более 20% .

Предложенный способ вольтамперометрического определения йода на органно-модифицированных электродах прост, позволяет существенно сократить время анализа и количество используемых реактивов, исключить использование металлической ртути (1 класс опасности) для формирования электрода, а также проводить измерения без аэрирования электролита инертными газами (азот, аргон) и может быть приемлем в любой химической лаборатории, особенно в настоящее время, когда налажен выпуск отечественной и зарубежной аппаратуры с контрольным управлением и обработкой данных.

Литература

1.ГОСТ Р 52689-2006 Продукты пищевые. Инверсионно-вольтамперометрический метод определения массовой концентрации йода. – М.: Стандартинформ, 2006, с. 25

THE EXPRESS IODINE DETERMINATION BIOLOGICAL ACTIVE ADDITIVIES BY VOLTAMMETRY METHOD

[1]Deryabina V.I. , [1]Slepchenko G.B., [1]Pham Cam Nhung, [1]Ho Sy Linh, [2]Yudina N.D.

[1] National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia
e-mail: microlab@tpu.ru
[2] Siberian Research Institute of Agriculture and peat with the RAAS, Tomsk, Russia
e-mail: dvitomsk@rambler.ru

One way to solve the problem of iodine deficiency is to feed animals with food allowance enriched with iodine compounds.

On the basis of the Siberian Institute of Agriculture and peat SB RAAS has developed biologically active supplements on the basis of humic substances, which are widely used as feed additives or fertilizers.

At present the method voltammetry (VA) is usually used to determine iodine and its compounds in different objects. Methods VA are appealing because the high information capabilities with simplicity of the signal measuring at a low cost of the equipment. State standard of the Russian Federation [1] is approved for determining the mass concentration of iodine in foods using the method VA.

We have studied the voltammetric conduct of iodide-ions on silver electrodes modified with aryl diazonium tosylate $ArN_2^+OTs^-$ (where Ar = p-$NH_2C_6H_4$, p-$HOOCC_6H_4$, p-$NO_2C_6H_4$). The main parameters selected for determining iodide-ions on organ-modified electrodes are: the time of electrolysis, the potential savings, the nature of the supporting electrolyte, etc. All the electrochemical measurements were performed on the analyzers "CTA" and “CTA – element” (OOO ITM, Tomsk) .

When comparing the calibration curves of analytical iodide-ions signals, obtained in various types of organ-modified electrodes, it was revealed that the maximum sensitivity was revealed to be possessed by an electrode, which was modified by amino aryl diazonium tosylate (MAgE - NH_2). Based on these results a methodical algorithm for quantitative chemical analyzing samples of dietary supplements on iodine content which includes The transfer of all forms of iodine in form of iodide ions from samples to solution, in this case alkaline oxidative fusion, followed by BA - the definition for MAgE - NH_2. In this case, the accumulation of iodide ions in the stirring solution is carried out within 10 – 20sec at a potential electrolysis (0,0 ± 0,05)V in respect chloride-silver electrodes against 0.1M hydrazine sulfate, followed by registration of cathodic peaks in the differential - pulsed recording voltammograms at scan rate potential of 20 mV / sec. Concentration of iodide ions is determined by the height of the peak in the range of potentials (- 0,4 ± 0,05)V in the method of additives certified mixtures.

The studies found that the determination of iodide ions Is not interfered by substances, whose presence is possible in water, food, feed, feeding additives, and biological materials: Zn, Co, Ni, Pb, Cu, Hg, Fe at the level of maximum allowable concentration .The correctness inspection of methodical data is carried out using the method “put - found”, doubling weighed portion and comparing with State standard of the Russian Federation. The detection limit is 0.03 mg / kg, and the relative standard deviation is - less than 20%.

The proposed method voltamperometric iodine in organ-modified electrodes is simple, significantly reduces the analysis time and number of used reagents, eliminates the use of metallic mercury (1 class of hazard) for forming an electrode, and implements measurements without aeration of the electrolyte using inert gases (nitrogen, argon) and may be accepted in any chemical laboratory, especially now, when the output of domestic and foreign equipment with control management and data processing has been improved.

References:

1. State standard of the Russian Federation 52689-2006 Foodstuffs. The stripping-voltammetric method for determination of iodine. - M.: Standartinform, 2006, p. 25

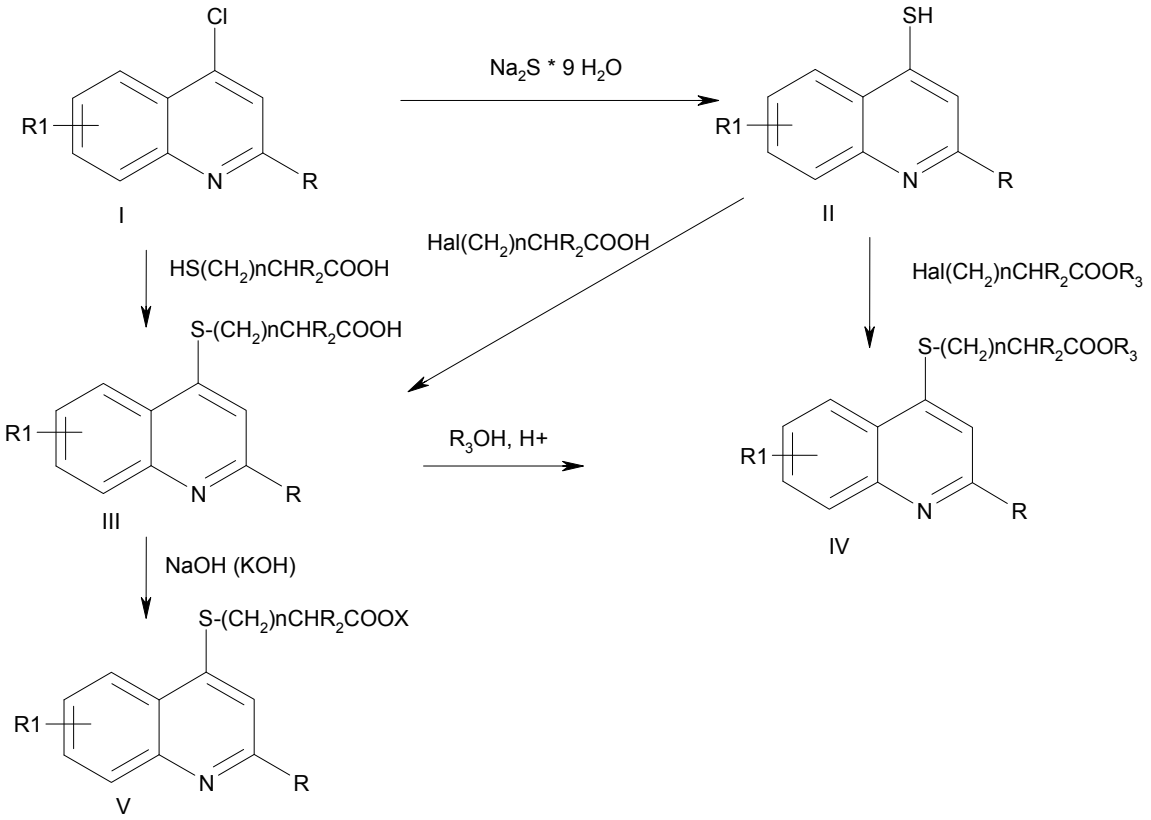
СИНТЕЗ ПОХІДНИХ 2-ФЕНІЛ-6(8)-ЗАМІЩЕНИХ-4-ТІОХІНОЛІНІВ ЯК ПОТЕНЦІЙНИХ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Добродуб І.В., Завгородній М.П., Бражко О.А., Генчева В.І.

Запорізький національний університет, Запоріжжя, Україна
e-mail: dobrodubinga@rambler.ru

Продовжуючи пошук біологічно активних речовин серед 4-тіопохідних хіноліну нами взаємодією 2-феніл-6(8)-R-4-хлорхіноліну (I) з $Na_2S \cdot 9\ H_2O$ в середовищі диметилформаміду синтезовано 2-феніл-6(8)-метокси-4-меркаптохіноліни (II) та 2-феніл-6-фтор-4меркаптохіноліни (II). Реакцією тіонування 2-феніл-6(8)-R-4-хлорхіноліну (I) з меркаптокислотами було одержано (хінолін-4-ілтіо)-карбонові кислоти (III). Етерифікація відповідних кислот в присутності метилового, етилового спирту призводить до утворення відповідних естерів (IV). (Хінолін-4-ілтіо)-карбонові кислоти отримані зустрічним синтезом – взаємодією 4-меркаптохінолінів (II) з галогенкарбоновими кислотами. Нейтралізація (хінолін-4-ілтіо)-карбонових кислот гідроксидом натрію та калію призводить до утворення відповідних солей (V).

Структуру синтезованих сполук підтверджено елементним аналізом, ПМР-спектрами та зустрічним синтезом, чистота – тонкошаровою хроматографією.



n=0,1; R=CH_3; R_1=6-OCH_3, F, 8-OCH_3; R_2=H, CH_3, NH_2, $NHCOCH_3$; R_3=CH_3, C_2H_5; X=Na, K

Віртуальний скринінг за допомогою комп'ютерної програми PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) показав, що отримані сполуки можуть проявляти протизапальну, нейро-, кардіопротекторну, гіперліпімічну, лікування аутоіммунних захворювань та інші види активності.

Проведення біологічного скринінгу свідчить про перспективність пошуку біологічно активних речовин серед похідних 2-феніл-6(8)-заміщених-4-тіохіноліну.

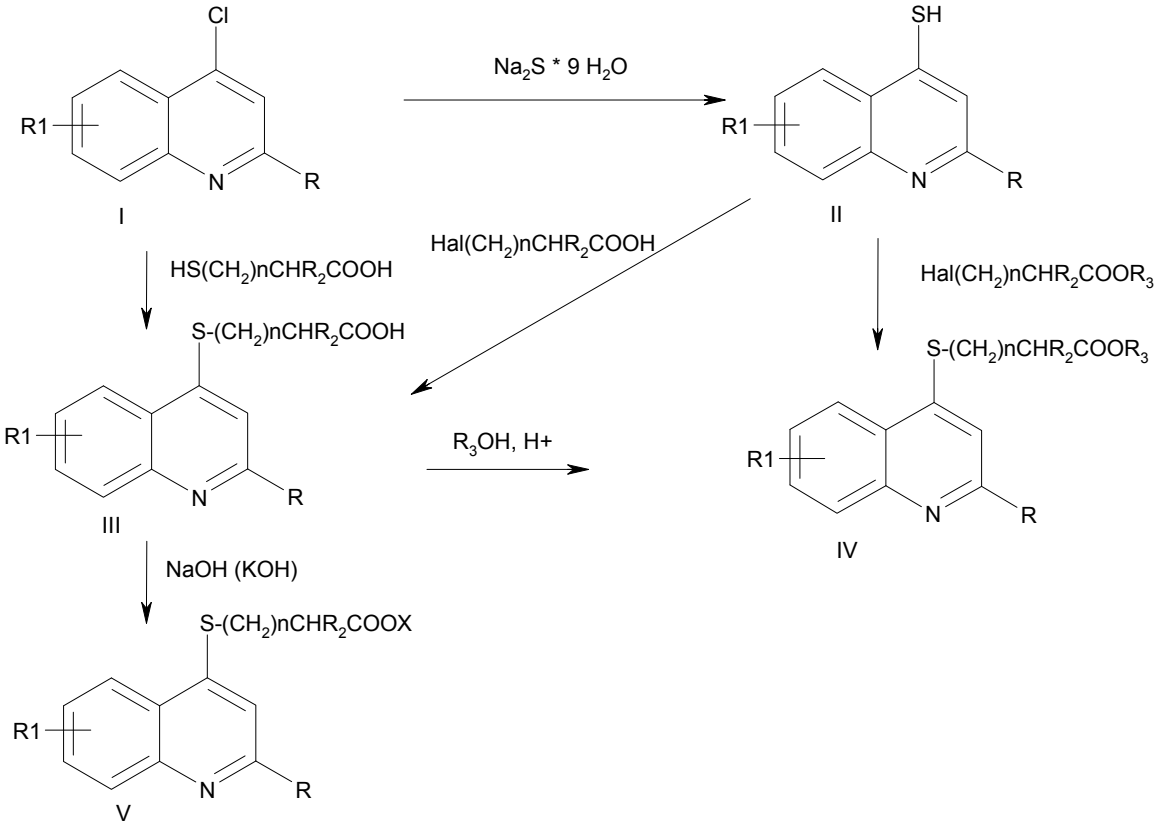
SYNTHESIS OF 2-PHENYL-6(8)-SUBSTITUTED-4-THIOQUINOLINES AS POTENTIAL BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Dobrodub I.V., Zavgorodniy M.P., Brazhko A.A., Gencheva V.I.

Zaporizhzhya National University, Zaporozhye, Ukraine
e-mail: dobrodubinga@rambler.ru

There is a search of biologically active substances among 4-thioderivatives quinoline. By interaction of 2-phenyl-6(8)-R-4-chlorquinoline (I) with Na_2S 9 H_2O among dimethylformamide synthesized 2-phenyl-6(8)-methoxy-4-mercaptoquinoline (II) and 2-phenyl-6-fluoro-4-mercaptoquinoline (II). The reaction tionation 2-phenyl-6(8)-R-4-chlorquinolin (I) was obtained from mercaptoacid (quinoline-4-ilthio)-carboxylic acid (III). Esterification of relevant acids in the presence of methyl, ethyl esters obtained relevant esters (IV). (Quinoline-4-ilthio)-carboxylic acid obtained counter synthesis − the interaction of 4-mercaptoquinoline (II) with halogenocarbone acids. Neutralization of (quinoline-4-ilthio)-carboxylic acids by alkaline agents leads to the formation of the salts (V).

The structure of the synthesized compounds is confirmed by elemental analysis, NMR-spectra and counter synthesis, purity − thin layer chromatography.



n=0,1; R=CH_3; R_1=6-OCH_3, F, 8-OCH_3; R_2=H, CH_3, NH_2, $NHCOCH_3$; R_3=CH_3, C_2H_5; X=Na, K

Virtual screening by a computer program PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) showed that the compounds may exhibit anti-inflammatory, neuro-, cardioprotectant, giper lipimichesky, treatment of autoimmune diseases and other types of activity.

Biological screening shows prospective search of biologically active substances among the derivatives of 2-phenyl-6(8)-substituted-4-tioquinoline.

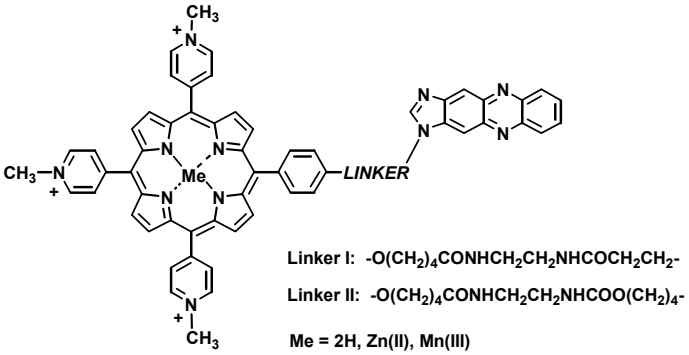
КОН'ЮГАТИ КАТІОННИХ ПОРФІРИНІВ З ІМІДАЗОФЕНАЗИНОМ ІЗ ПРОТИПУХЛИННОЮ АКТИВНІСТЮ

[1]Дубей Л.В., [2]Погрібний П.В., [1]Дубей І.Я.

[1] Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, Україна
e-mail: dubey@imbg.org.ua
[2] Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна

Теломерна ДНК та теломераза є перспективними мішенями сучасної протипухлинної терапії. Теломери – багаті гуаніном послідовності ДНК, розташовані на кінцях хромосом. В пухлинних клітинах експресується фермент теломераза, тоді як у нормальних клітинах теломераза активність відсутня. Теломерна ДНК утворює т.зв. G-квадруплексні структури, що складаються зі стопок гуанінових квартетів. Специфічне зв'язування малих молекул з G-квадруплексами інгібує теломеразу активність і веде до загибелі ракових клітин. Метою даної роботи було створення нових протипухлинних препаратів на основі порфіринів, спрямованих на теломерну ДНК.

Ми синтезували серію нових похідних тетра(метилпіридиній)порфірину (TMPyP), який ефективно зв'язується з G-квадруплексними структурами, інгібуючи теломеразу. Катіонний TMPyP та його Zn(II) і Mn(III) металокомплекси ковалентно приєднали через гнучкі лінкерні групи до нейтрального інтеркалятора імідазофеназину (ImPhz) для покращення зв'язування з ДНК. Було отримано кон'югати з двома типами лінкерних груп різної довжини та структури.



Вивчили антипроліферативну активність кон'югатів, що містять лінкер типу I, *in vitro* на культурі клітин карциноми Льюїса легень миші (лінія LLC), використовуючи метод включення радіоактивної мітки для кількісного аналізу зразків. Клітини інкубували протягом 24 год. при 37°C у середовищі RPMI 1640, що містило 5% фетальної сироватки бика (FBS) та [^{3}H]-тимідин (1 мкКі) у присутності різних концентрацій інгібіторів (10-200 мкМ). Кількість включеної мітки визначали на рідинному сцинтиляційному аналізаторі. Радіоактивність пропорційна кількості живих клітин у культурі, а рівень інгібування відповідає вмісту загиблих клітин порівняно з контролем (реакція за відсутності інгібітора). На основі отриманих даних було побудовано графіки залежності активності препаратів від їх концентрації, з яких визначили величини IC_{50}.

Всі досліджені сполуки виявили значну протипухлинну активність, причому металокомплекси значно активніші, ніж не металізований кон'югат (Me=2H). Останній повністю пригнічував ріст клітин у концентрації ~200 мкМ (IC_{50} 22 мкМ). Комплекс Mn(II) демонстрував 75% інгібування при 50 мкМ (IC_{50} 11 мкМ), в той час як при цій же концентрації досягалось повне пригнічення найбільш активною похідною Zn(II) (IC_{50} 6 мкМ).

Таким чином, кон'югати інтеркалюючого барвника ImPhz з G-квадруплексним лігандом TMPyP ефективно пригнічують ріст пухлинних клітини *in vitro* в мікромолярних концентраціях, а їх величини IC_{50} співставимі з доксорубіцином та вінкристином.

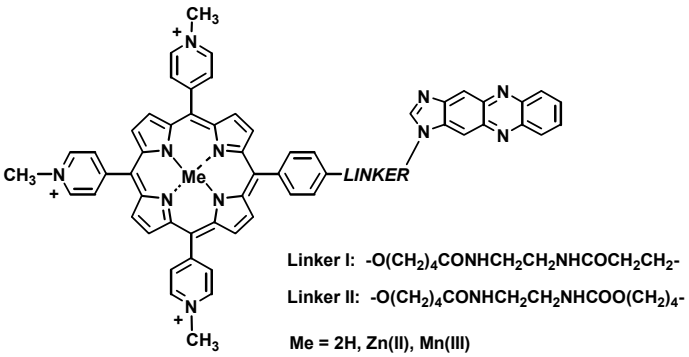
CATIONIC PORPHYRIN-IMIDAZOPHENAZINE CONJUGATES WITH ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY

[1]Dubey L.V., [2]Pogrebnoy P.V., [1]Dubey I.Ya.

[1] Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences, Kyiv, Ukraine,
e-mail: dubey@imbg.org.ua
[2] R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology,
National Academy of Sciences, Kyiv, Ukraine

Telomeric DNA and telomerase are promising targets for modern anticancer therapy. Telomeres are guanine-rich DNA sequences located at the end of the chromosomes. Cancer cells express the telomerase enzyme, whereas normal cells have no telomerase activity Telomeric DNA forms so-called G-quadruplex structures consisting of the stacks of guanine quartets. The specific binding of small molecules to G-quadruplexes inhibits telomerase activity and thus leads to the death of cancer cells. The aim of this study was the development of new porphyrin-based antitumor agents targeting telomeric DNA.

We have synthesized a series of new derivatives of tetra(methylpyridinium)porphyrin (TMPyP) which efficiently binds to G-quadruplex structures inhibiting the telomerase. Cationic TMPyP and its Zn(II) and Mn(III) metalocomplexes were covalently attached via flexible linker groups to the neutral intercalating agent imidazophenazine (ImPhz) to improve their binding to DNA. Conjugates with two types of linkers of different length and structure were obtained.



Antiproliferative activity of conjugates containing the linker I was tested *in vitro* on a mouse Lewis lung carcinoma cell culture (LLC line) using the inclusion of radioactive label for quantitative analysis of samples. Cells were incubated for 24 h at 37°C in RPMI 1640 medium containing 5% fetal bovine serum (FBS) and [^{3}H]-thymidine (1 μCi) in the presence of various concentrations of inhibitors (10-200 μM). The amount of absorbed radioactive label was determined with liquid scintillation analyzer. The radioactivity is proportional to the number of live cells in the culture, and the inhibition level corresponds to the number of dead cells, in comparison to the control (reaction without an inhibitor). The activity-concentration plots were obtained from which IC_{50} values of compounds were determined.

All the tested compounds demonstrated high antiproliferative activity, metal complexes being several times more active than non-metalated conjugate (Me=2H). The latter compound fully inhibited cell growth at the concentration ~200 μM (IC_{50} 22 μM). Mn(III) complex showed 75% inhibition at 50 μM (IC_{50} 11 μM), while the complete inhibition of tumor cells was achieved at this concentration with the most active Zn(II) derivative (IC_{50} 6 μM).

Thus, conjugates of the intercalating dye ImPhz with G-quadruplex ligand TMPyP efficiently suppress tumor cells *in vitro* at micromolar concentrations with IC_{50} values comparable to those of doxorubicin and vincristine.

БИОСИНТЕЗ КЕФИРАНА

Еникеев Р.Р., Зимичев А.В.

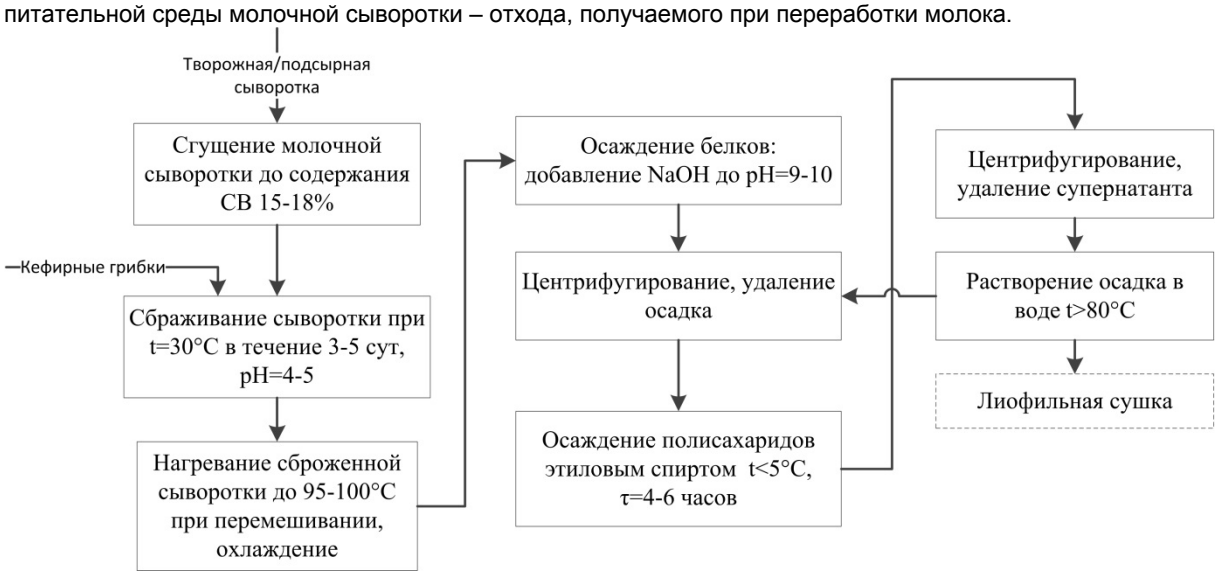
Самарский государственный технический университет, Самара, Россия
e-mail: fpp@samgtu.ru

Кефиран – это экзополисахарид, который связывает микроорганизмы кефирных грибков и производится некоторыми молочнокислыми бактериями, входящими в состав кефирных грибков.Он состоит из остатков глюкозы и галактозы примерно в равном соотношении. Интерес к полисахарид-продуцирующим молочнокислым бактериям объясняется тем, что эти полисахариды влияют на реологические свойства молочных продуктов и выполняют функции загустителей, стабилизаторов, эмульгаторов и влагоудерживающих веществ.

Актуальность изучения строения и физико-химических свойств кефирана, а также необходимость решения проблем промышленного производства, определяются уникальным действием этого полисахарида на организм.Показано, что кефиран обладает иммуномодулирующим, противоопухолевым, противовоспалительным, противоастматическим ранозаживляющим действием. Он способствует снижению кровяного давления и уровня холестерина в кровиа за счет связывания гепатоэнтерально циркулирующего холестерина в кишечнике. Также кефиран обладает ингибирующим действием в отношении патогенных микроорганизмов рода Salmonella, Helicobacter, Shigella, Staphylococcus, и Escherichiacoli [1–3].

Благодаря своим свойствам, кефиран может использоваться в пищевой и косметической промышленности, а также в медицине. Экстракция кефирнана из кефирных грибков в промышленных масштабах представляется сложной и дорогостоящей, поэтому интерес представляют более простые в техническом отношении методы. В настоящее время существуют решения биосинтеза кефирана с использованием определенных штаммов, выделенных из кефирных грибков, при культивировании на питательной среде заданного состава [4, 5]. При высокой относительном выходе полисахарида, принимая во внимание затраты на сырье и экстракцию, а также доступность микробиологической культуры, данные технологии малорентабельны.

Предлагаемая технология биосинтеза кефирана предусматривает использование в качестве питательной среды молочной сыворотки – отхода, получаемого при переработки молока.



Литература:

1. *Shiomi M. et al.* Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain // Jpn. J. Med. Sci. Biol., 1982, Vol. 35, № 2. – P. 75–80.
2. *Rodrigues K.L. et al.* Antimicrobialandhealingactivity of kefir and kefiran extract // International Journal of Antimicrobial Agents, 2005, Vol. 25. – P. 404–408.
3. *Maeda H., Zhu X., Mitsuoka T.* Effects of an exopolysaccharide (kefiran) from Lactobacillus kefiranofaciens on blood glucose in KKAy mice and constipation in SD rats indused by low-fiber diet // Bioscience Microflora, 2004, Vol. 23, № 4. – P. 149–153
4. *Cheirsilp B., Shimizu H., Shioya S.* Modelling and optimization of environmental conditions for kefiran production by Lactobacillus kefiranofaciens // Appl. Microbiol. Biotechnol, 2001, Vol. 57. – P. 639–646.
5. *Yokoi H., Watanabe T.* Optimum culture conditions for production of kefiran by Lactobacillus sp. KPB-167B isolated from kefir grains // Journalof Fermentation and Bioengeneering, 1992, Vol. 74, № 5. – P. 327–329.

KEFIRAN BIOSYNTHESIS

Enikeev R.R., Zimichev. A.V.

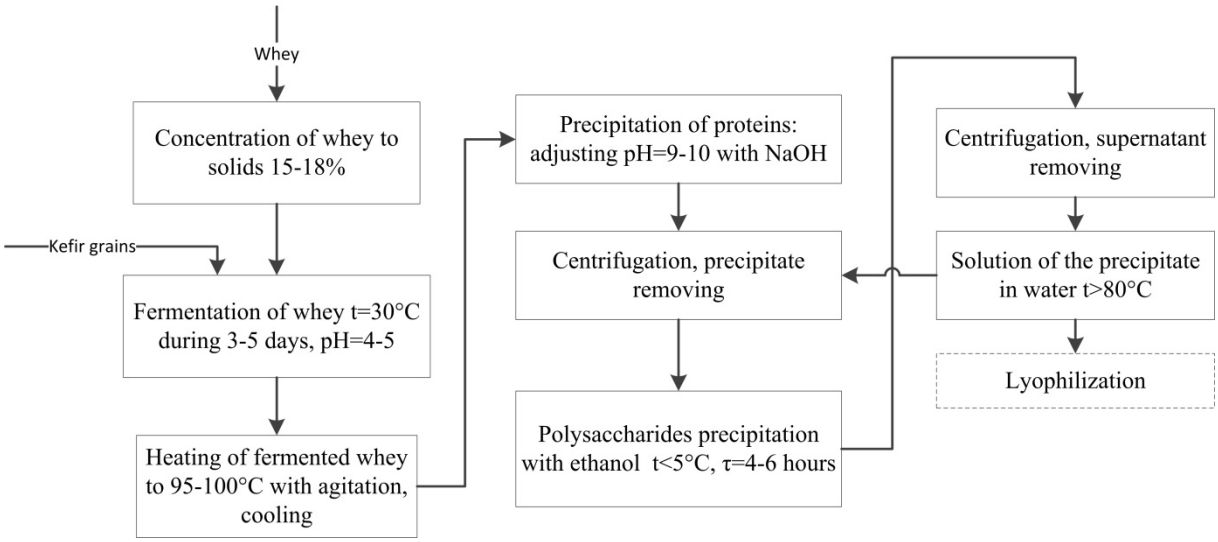
Samara State Technical University, Samara, Russian Federation
e-mail: fpp@samgtu.ru

Kefiran is an exopolysaccharide embedding the microorganisms inside kefir grains and is produced by some lactic acid bacteria. It contains approximately equal amounts of glucose and galactose. Interest in exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria has increased recently because organisms produce polysaccharides important in determining the rheological properties of dairy products. In fermented milk products bacteria polysaccharides function as thickeners, stabilizers, emulsifiers, and water binding agents.

The importance of researching of kefiran physical and chemical properties as well as problem of its industrial production is defined by unique health effect. . Kefiranhasbeenreported to have immunomodulating, antitumor, anti-inflammatory, antiasthmatic, anti-allergic and healing activity. It also decreases cholesterol blood level by trapping enterohepatic-circulating cholesterol in the intestine and provides inhibiting activity towards pathogen microorganisms Salmonella, Helicobacter, Shigella, Staphylococcus, и Escherichia coli [1–3].

It is highly perspective to use kefiran in medicine, food production and especially in cosmetic industry. Extractionofkefiranfrom kefir grains on an industrial scale is difficult and expensive: a simpler procedure for mass production of this polymer is therefore of interest. At present there are some solutions of kefiran biosynthesis based on the monoculture fermentation on a specific media [4, 5]. Taking into consideration raw material expenses and availability of the microbiological culture these technologies are not sufficiently remunerative.

Proposed technology of kefiran biosynthesis based on kefir grains fermentation of whey – waste product of dairy industry produced in large amounts.



References:

1. *Shiomi M. et al.* Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain // Jpn. J. Med. Sci. Biol., 1982, Vol. 35, № 2. – P. 75–80.
2. *Rodrigues K.L. et al.* Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract // International Journal of Antimicrobial Agents, 2005, Vol. 25. – P. 404–408.
3. *Maeda H., Zhu X., Mitsuoka T.* Effects of an exopolysaccharide (kefiran) from Lactobacillus kefiranofaciens on blood glucose in KKAy mice and constipation in SD rats indused by low-fiber diet // Bioscience Microflora, 2004, Vol. 23, № 4. – P. 149–153
4. *Cheirsilp B., Shimizu H., Shioya S.* Modelling and optimization of environmental conditions for kefiran production by Lactobacillus kefiranofaciens // Appl. Microbiol. Biotechnol, 2001, Vol. 57. – P. 639–646.
5. *Yokoi H., Watanabe T.* Optimum culture conditions for production of kefiran by Lactobacillus sp. KPB-167B isolated from kefir grains // Journal of Fermentation and Bioengeneering, 1992, Vol. 74, № 5. – P. 327–329.

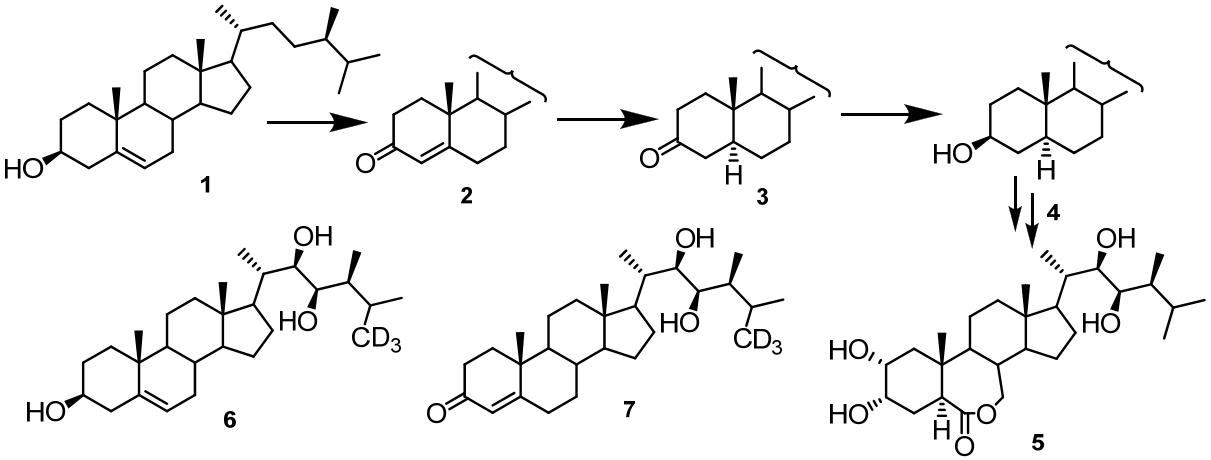
СИНТЕЗ РАННИХ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ БРАССИНОЛИДА, МЕЧЕННЫХ ПО С-26

Жабинский В.Н., Хрипач В.А., Гулякевич О.В., Ермолович Ю.В.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: khripach@iboch.bas-net.by

Современная точка зрения на биосинтез брассиностероидов (БС) предполагает существование одновременно нескольких метаболических путей от вездесущих стеринов к полностью функционализированным растительным гормонам (напр., из кампестерина **1** для 28С-БС в брассинолид **5**). Экспериментальным подтверждением такой множественности биосинтетических путей является выделение за время изучения БС около 70 соединений данного класса. Несмотря на достигнутые за последние 30 лет успехи в изучении биосинтеза БС, получаемые результаты однозначно свидетельствуют о необходимости продолжения исследований. Необходимой их предпосылкой является доступность должным образом меченых соединений.

В настоящей работе будет обсужден синтез меченых тремя атомами дейтерия по С-26 22R,23R-дигидроксистероидов (напр., **6** и **7**) со строением стероидной циклической части, отвечающей ранним стадиям биосинтеза БС.



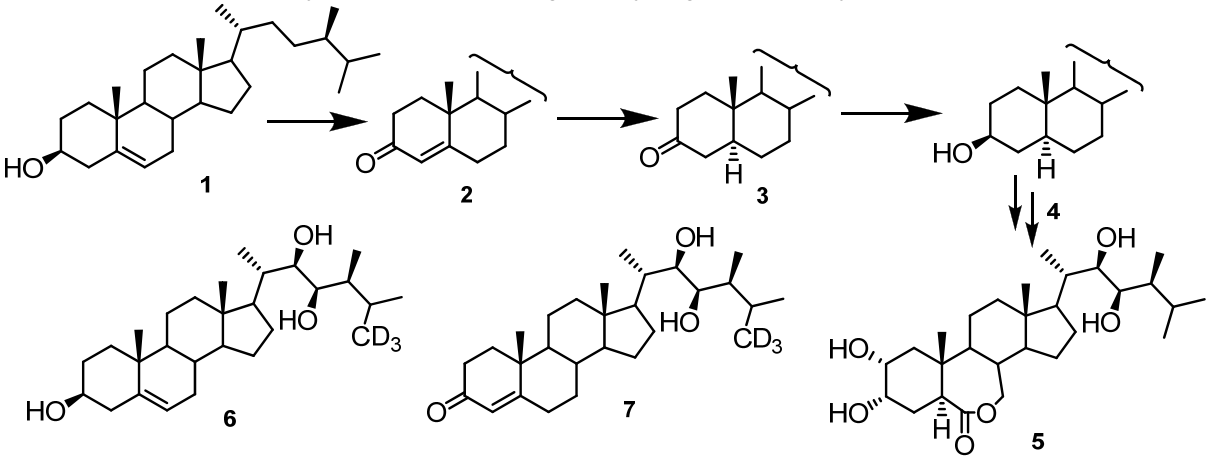
SYNTHESIS OF BRASSINOLIDE EARLY BIOSYNTHETIC PRECURSORS LABELED AT C-26

Zhabinskii V.N., Khripach V.A., Gulyakevich O.V., Ermolovich Yu.V.

Institute of Bioorganic Chemistry, Minsk, Belarus
e-mail: khripach@iboch.bas-net.by

The current view of the brassinosteroid (BS) biosynthesis envisages multiple parallel pathways in a metabolic grid leading from ubiquitous sterols to fully functionalized plant hormones (eq., campesterol **1** for 28C-BS to brassinolide **5**). Although a lot has been done in this area over the past thirty years resulting in identification of about 70 related to brassinolide new compounds (reflecting the existence of certain biosynthetic pathways), the subject is far from being yet exhausted. An essential prerequisite for further detailed studies of BS biosynthesis is the availability of the properly labeled compounds.

We will discuss in the present work preparation of labeled steroidal 22R,23R-dihydroxy derivatives (eg., compounds **6** and **7**) with a cyclic part corresponding to early stages of BS biosynthesis.



СИНТЕЗ И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АРГИНИНСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ГЕМИНА С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ НОВЫХ БИОЦИДНЫХ АГЕНТОВ

[1]Желтухина Г.А., [1]Окороченков С.А., [2]Небольсин В.Е.

[1]Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
e-mail: laboratory211@yandex.ru
[2]ООО «Фарминтерпрайсез», Москва, Россия

Целью данной работы явилось создание новых биоцидных агентов на основе конъюгатов природных соединений: гемина, аминокислот и пептидов (КГ), установление взаимосвязи между структурой и биологической активностью и выявление мишеней для их воздействия.

С этой целью осуществлен синтез ряда новых аргининсодержащих моно- и дизамещенных производных гемина в растворе и на твердой фазе. Конъюгат гемина с одной молекулой гексапептида combi-1, включающего три остатка аргинина, был успешно синтезирован по разработанной нами ранее методике [1] твердофазным методом по Fmoc-стратегии на полимере с тритилхлоридной якорной группой. Конъюгат гемина с одной молекулой фрагмента фибронектина RGD получен в растворе по оригинальной схеме с применением силилирования.

Предложены различные подходы к синтезу КГ, включающих Glu(ArgOMe)ArgOMe, и выбрана оптимальная схема его синтеза.

Исследование воздействия КГ на мультирезистентные грамположительные бактерии (*Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Micrococus luteus*) и на грибы *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans* показало, что наиболее высокой антибактериальной и противогрибковой активностью в ряду новых Arg-содержащих КГ обладает соединение, включающее разветвленный пептид.

На основании полученных результатов можно сделать заключение о том, что наличие нескольких остатков аргинина, присутствие заместителей по двум пропионовокислым остаткам гемина, и что наиболее важно - разветвленная структура заместителя в КГ способствует проявлению антимикробной активности.

С применением методов флуоресцентной спектроскопии продемонстрировано выраженное усиление проницаемости модельной мембраны под действием новых и известных аргининсодержащих КГ, представляющее собой один из возможных механизмов их биоцидной активности. Экспериментально подтверждена нуклеолитическая активность аргининсодержащих КГ в отношении ДНК вируса герпеса простого как в составе цельного вириона, так и изолированной, с применением метода ПЦР, а также вирулицидное действие КГ в отношении безоболочечного вируса полиомиелита.

Таким образом, аргининсодержащие КГ являются перспективными биоцидными агентами, механизм действия которых включает деструктивное действие как на липидную мембрану, так и на нуклеиновую кислоту патогена.

Литература:

1.*Г.А. Желтухина, Т.Н. Лобанова, В.Е. Небольсин, М.О. Галлямов, С.М. Драницына, И.А. Костанян.* // Синтез и структурно-функциональные исследования искусственных нуклеаз на основе конъюгатов гемина с пептидными фрагментами фактора дифференцировки клеток HLDF - Биоорган. химия, 2006, т. 32, N2, с. 198-210

SYNTHESIS AND STRUCTURE-FUNCTION STUDIES OF HEMIN ARGININE DERIVATIVES TO CREATE THE NEW BIOCIDAL AGENTS

[1]Zheltukhina G.A., [1]Okorochenkov S.A., [2]Nebolsin V.E.

[1]Moscow State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia
e-mail: laboratory211@yandex.ru
[2]LTD "Pharmenterprises", Moscow, Russian

The purpose of this work was the creation of new biocidal agents on the basis of conjugates of natural occurring compounds: hemin, amino acids and peptides (HC), to establish the relationship between structure and biological activity and identifying the targets for their action.

For this purpose, the synthesis of a number of new hemin mono- and disubstituted arginine derivatives was carried out in solution and on solid phase. Hemin conjugate with one molecule of hexapeptide, combi-1, there are three arginine residues, was successfully synthesized according to our previous procedure [1], by solid-phase method using Fmoc-strategy on the polymer with tritilchlorid anchor group. Hemin conjugate with one molecule of fibronectin RGD fragment was synthesized in solution in agreement with original scheme using sililation.

Various approaches to the synthesis of HC, including Glu(ArgOMe)ArgOMe, were proposed and the best scheme of its synthesis was chosen.

The study of HC effects on multiresistant Grampositive bacteria (*Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Micrococus luteus*) and the fungi *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* showed that the compound containing the branched peptide has a highest antibacterial and antifungal activities in a series of new Arg-containing HC.

Based on these results we can conclude that the presence of several arginine residues, the presence of substituents on two propionic acid hemin residues and, most importantly, a branched structure of the HC substituent, promotes the increasing of antimicrobial activity.

By using of fluorescence spectroscopy techniques the significant increasing of the model membrane permeability under the influence of new and known Arg-containing HC was showed, that is one of the possible mechanisms of their biocidal activity. The nucleolytic activity of HC, containing arginine, against the DNA of herpes simplex both in the composition of whole virion and isolated using the PCR method, and virucidal action of HC against membrane-free poliovirus were experimentally confirmed.

Thus, arginine-HC are promising biocidal agents, which mechanism of action includes the both destructive action on the lipid membrane and nucleolytic effect on the pathogen nucleic acids.

References:

1. *G.A. Zheltukhina, T.N. Lobanova, V.E. Nebolsin, M.O. Gallyamov, S.M. Dranitsyna, I.A. Kostanyan.* // Synthesis and structure-function studies of synthetic nucleases on the basis of hemin conjugates with peptide fragments of cell differentiation factor HLDF - Bioorganic Chem, 2006, vol. 32, N2, p. 198-210.

СИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫХ ФЕРРОЦЕНИЛПИРИМИДИНОВ

[1] Жеребкер К.Я., [1]Сименел А.А., [1]Родионов А.Н., [2] Качала В.В.

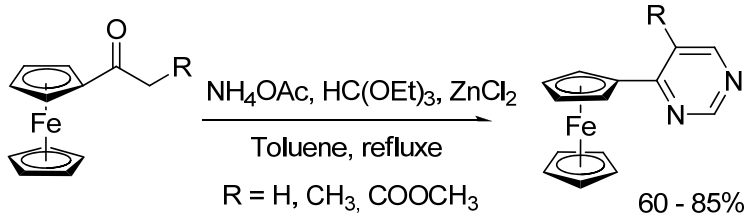
[1] Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия
e-mail: kiryonok@yandex.ru
[2] Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

Соединения ферроцена с гетероциклами проявляют широкий спектр биологической активности [1]. Кроме того, оптически активные производные ферроценилгетероциклов интересны как лиганды в асимметрическом катализе [2].

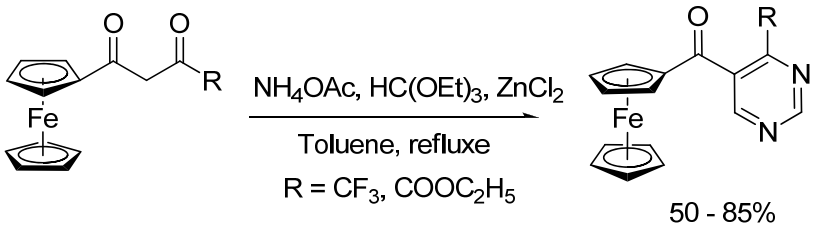
Был получен ряд новых гетероциклических производных ферроцена - ферроценилпиримидинов.

4,5-Дизамещенные ферроценилпиримидины были получены из ферроценилалкилкетонов и 1,3-дикарбонильных производных ферроцена.

При взаимодействии ферроценилалкил кетонов или соответствующих ферроцениленаминов, ортомуравьиного эфира и ацетата аммония в толуоле при катализе хлоридом цинка в одну стадию были получены 4-ферроценилпиримидины.



При использовании в качестве исходных реагентов 1,3-дикарбонильных производных ферроцена или их синтетических аналогов в качестве продуктов были выделены 5-ферроценоилпиримидины.



Исходные 1,3-дикарбонильные соединения были синтезированы с высокими выходами при конденсации Кляйзена ацетилферроцена с различными сложными эфирами в присутствии третбутоксида калия в бензоле [3].

Полученные соединения были охарактеризованы стандартными спектральными методами (ИК, ^{1}H, ^{13}C ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия) и данными элементного микроанализа.

В дальнейшем планируются биологические испытания полученных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук (программа Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине»), Отделения химии и наук о материалах Российской академии наук (программа фундаментальных исследований «Медицинская и биомедицинская химия») и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 09.03.00535).

Литература

1. *Л.В. Снегур, В.Н. Бабин, А.А. Сименел, Ю.С. Некрасов, Л.А. Островская, Н.С. Сергеева,* Противоопухолевая активность соединений ферроцена, Изв. АН. Сер. хим., **2010,** 2113-2124.
2. Ferrocenes−Homogeneous Catalysis−Organic Synthesis−Materials Science. Edited by A. Togni and T. Hayashi. VCH: New York. **1994.**
3. A.*N. Rodionov, A.A. Simenel, A.A. Korlyukov, V.V. Kachala, S.M. Peregudova, K.Ya. Zherebker, E.Yu. Osipova*, “Synthesis and properties of 5-ferrocenyl-1*H*-pyrazole-3-carbaldehydes” Journal of Organometallic Chemistry (**2011**), doi:10.1016/j.jorganchem.2010.11.018

SYNTHESIS OF BIOLOGICAL ACTIVE FERROCENYLPYRIMIDINES

[1]Zherebker K.Ya., [1]Simenel A.A., [1]Rodionov A.N., [2]Kachala V.V.

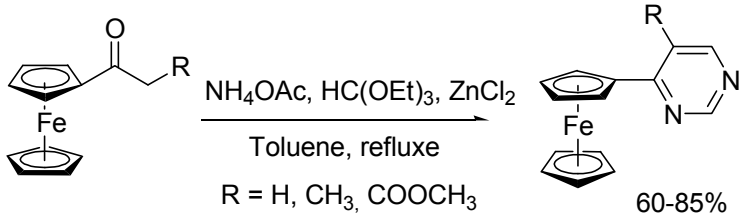
[1]A.N. Nesmeyanov Institute of OrganoElement Compounds, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
e-mail: kiryonok@yandex.ru
[2]N.D. Zelynski Institute of Organic Chemistry , Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Ferrocene-containing heterocycles was found to exhibit a wide range of bioactivity with low toxicity [1]. Moreover optically active ferrocene heterocycles derivatives are interesting as ligands in asymmetric catalysis [2].

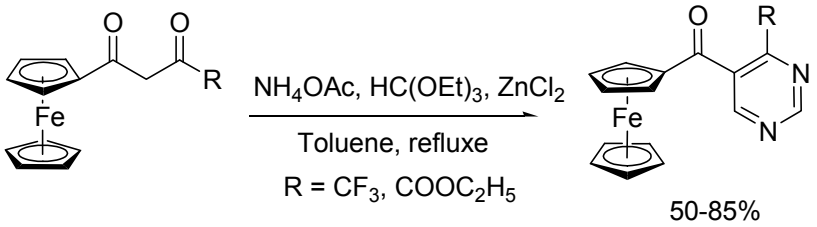
New ferrocene-substituted heterocycles – ferrocenylpyrimidines were synthesized.

4,5-Disubstituted ferrocenylpyrimidines were obtained from ferrocenylalkylketones and 1,3-dicarbonyl derivatives of ferrocene.

4-Ferrocenylpyrimidines were obtained via the $ZnCl_2$-catalyzed three-component coupling reaction involving a variety of functionalized ferrocenylalkylketones or ferrocenylenamines, triethylorthoformate and ammonium acetate with high yields:



The procedure can be successfully applied to the efficient synthesis of 5-ferrocenoylpyrimidines using 1,3-dicarbonyl derivatives of ferrocene instead of ketones:



1,3-Dicarbonyl derivatives of ferrocene were prepared with high yields by means of Claisen condensation of acetylferrocene with different esters in presents of potassium tertbutoxide in benzene [3].

The structures of compounds have been assigned on the basis of ^{1}H and ^{13}C NMR, mass-spectra data and microanalysis.

This work was supported by the Russian Academy of Sciences (Presidium Program "Fundamental Sciences – for Medicine"), by the Department of Chemistry and Materials Science (Program 'Medicinal and Biomolecular Chemistry'), and by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR No 09-03-00535).

References:

1. *L.V. Snegur, V.N. Babin, A.A. Simenel, Yu.S. Nekrasov, L.A. Ostrovskaya, N.S. Sergeeva,* "Antitumor activities of ferrocene compounds", Russ. Chem. Bull., **2010**, *No. 12*.
2. Ferrocenes−Homogeneous Catalysis−Organic Synthesis−Materials Science. Edited by A. Togni and T. Hayashi. VCH: New York. **1994**.
3. *A.N. Rodionov, A.A. Simenel, A.A. Korlyukov, V.V. Kachala, S.M. Peregudova, K.Ya. Zherebker, E.Yu. Osipova,* "Synthesis and properties of 5-ferrocenyl-1*H*-pyrazole-3-carbaldehydes", Journal of Organometallic Chemistry (**2011**), doi:10.1016/j.jorganchem.2010.11.018

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД СИНТЕЗА АНАЛОГОВ ПРОИЗВОДНЫХ ХАЛКОНОВ

Исмаилова Г.О., Талипов С.А., Мавлянов С.М.

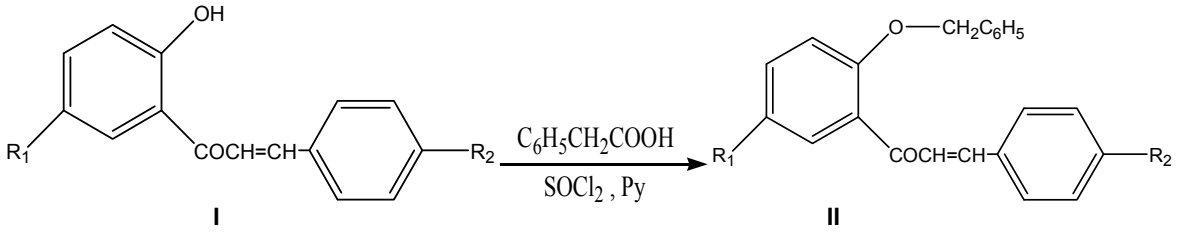
Институт биоорганической химии Академия наук Республики Узбекистан, Ташкент, Узбекистан
e-mail: rahimov_r_n@mail.ru

Учитывая ценные фармакологические свойства халконов, обладающих широким спектром биологического действия, нами модифицированным методом осуществлен синтез некоторых аналогов халконов.

2′-Гидроксихалконы и их производные являются активными исходными соединениями в синтезах различных типов флавоноидов, которые показывают выраженную биологическую активность.

Исходные халконы **I** получены в результате конденсации подходящего 2′-гидроксиацетофенона с соответствующими альдегидами.

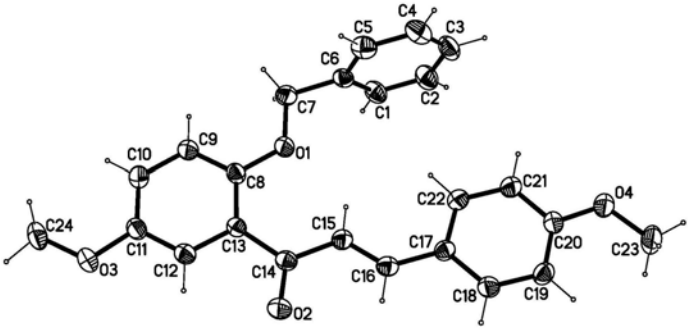
Смесь соответстующего халкона (10 ммоль) **I**, фенилуксусной кислоты (10 ммоль) и 20мл пиридина перемешивая, прибавляли по каплям в раствор 2 мл $SOCl_2$. Смесь перемешивая кипятили 1 час. После охлаждения добавляли 5 мл 1%-ного раствора HCl. Затем промывали 1% раствором Na_2CO_3 и снова промывали водой. Так образуются нижеследующие соединения **II**.



R_1=R_2=H; R_1=H, R_2=$N(CH_3)_2$; R_1=H, R_2=NO_2; R_1=H, R_2=OCH_3; R_1=CH_3, R_2=H; R_1=CH_3, R_2=OCH_3; R_1=OCH_3, R_2= OCH_3; R_1=CH_3, R_2=NO_2; R_1= Cl, R_2= NO_2

Синтезированные производные халконы **II** - кристаллические вещества желтого или бледно-желтого цвета с блестящими оттенками, некоторые из них в виде лепестков с хорошими выходами, растворимые в органических растворителях и нерастворимые в воде.

Структуры синтезированных соединений **II** доказаны ренгеноструктурным анализом. К примеру, кристаллы нового производного халкона **II** (R_1=OCH_3, R_2= OCH_3) были выращены из раствора в изопропаноле при комнатной температуре. Кристаллографические параметры монокристалла определены и уточнены на CCD-дифрактометре «Xcalibur»: кристаллы ромбические, a=7,263(2) Å, b=12,825(2) Å, c=21,031(3) Å, V=1959.3(5) $Å^3$, M=374,42, Z=4, $D_{выч.}$= 1.27 г/$см^3$, пр.гр. $P2_12_12_1$, R=0.0351 для 1792 отражений. Атомы исходного халкона находятся в одной плоскости, а плоскость атомов замещенного фенильного цикла перпендикулярна к исходной плоскости.



Литература:

1.*А.Айтмамбетов, Г.О.Исмаилова, З.А.Менлимуратова.* //Модифицированные флавоноиды I X. Синтез 7-метоксикарбонилметокси-3-гетарилхромонов. – Вестник ККО АН РУз, 1998, №2-3, с. 94-98

2.*А.Айтмамбетов, В.П. Хиля, А.А.Кубжетерова.* // Синтетические аналоги природных флаволигнанов X. Взаимодействие флавонов и их тиоксопроизводных с гидроксиламином. - Химия природ. соедин., 2000, №1, с. 37-39

MODIFIED METHOD OF SYNTHESIS OF ANALOGUES DERIVATIVES CHALCONES

Ismailova G.O., Talipov S.A., Mavlyanov S.M.

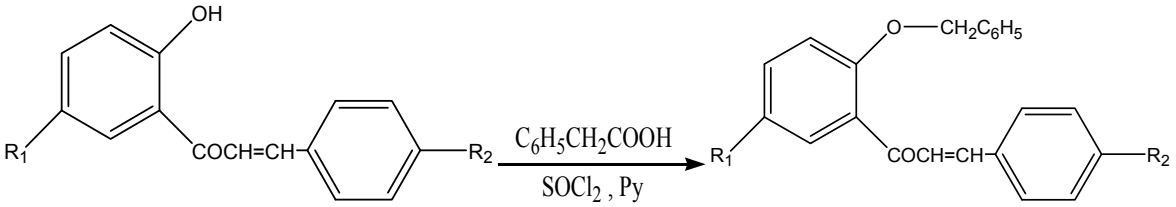
Institute of Bioorganic chemistry, Academy of sciences Republic of Uzbekistan,Tashkent, Uzbekistan
e-mail: rahimov_r_n@mail.ru

Given the valuable pharmacological properties of chalcones with a wide range of biological actions, we have modified the method of the synthesis of some analogues of chalcones.

2'-Hydroxychalcones and their derivatives are the active parent compound in the synthesis of various types of flavonoids, which show pronounced biological activity.

Initial chalcones **I** obtained by condensation of the appropriate 2'-hydroxyacetophenone to the corresponding aldehydes

Mixture of corresponding chalcone (10 mmol) **I**, phenylacetic acid (10 mmol) and pyridine (20ml) with stirring, was added drop wise a solution of 2 ml $SOCl_2$. Stirring the mixture was boiled for 1 hour. After cooling, it was added 5 ml of 1% HCl solution. Then the mixture washed with 1% solution of Na_2CO_3 and again washed with distiiled water. In this way were formed of the following compounds **II**:

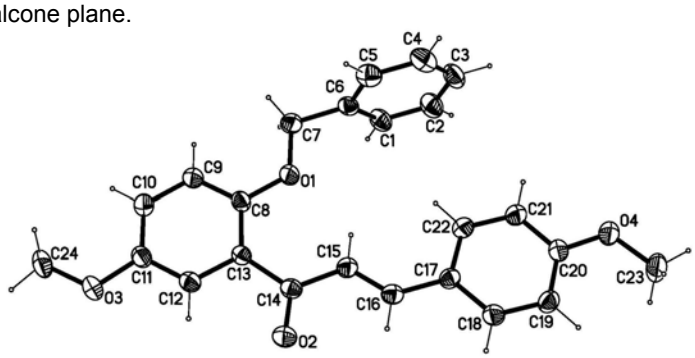


I **II**

R_1=R_2=H; R_1=H, R_2=$N(CH_3)_2$; R_1=H, R_2=NO_2; R_1=H, R_2=OCH_3; R_1=CH_3, R_2=H;
R_1=CH_3, R_2=OCH_3; R_1=OCH_3, R_2= OCH_3; R_1=CH_3, R_2=NO_2; R_1= Cl, R_2= NO_2

Synthesized derivatives chalkones **II** are yellow crystalline compounds or pale yellow in color with bright hues, some of them in the form of the petals with good yields, which are soluble in organic solvents and insoluble in water.

Structure of the synthesized compounds **II** established by X-ray analysis. For example, crystals of a new chalcone derivative **II** (R_1=OCH_3, R_2= OCH_3) were obtained by slow evaporation of a solution in isopropanol at the room temperature. The crystal data are as follows (CCD-diffractometer «Xcalibur»): crystals rhombics, a=7,263(2) Å, b=12,825(2) Å, c=21,031(3) Å, V=1959.3(5) $Å^3$, M=374,42, Z=4, $D_{calc.}$= 1.27 g/cm^3, sp.gr. $P2_12_12_1$, R=0.0351 for 1792 reflection. Initial chalcone atoms are planar and the plane of atoms substituted phenyl cycle is perpendicular to the chalcone plane.



References:

1.*A.Aitmambetov, Г.О.Исмаило G.O.Ismailova, Z.A.Menlimuratova.* // Modifieds flavonoids IX. Synthes 7-methoxycarbonilmethoxy-3-getarylchromones.- Vestnic KKD AS RUz, 1998, №2-3, p. 94-98.

2. *A.Aitmambetov, V.P.Khilya, A.A.Kubjeterova.* // Synthesize analogues natural flavolignans X. Reciprocity flovones and they tiokcoderivatives with gidroxylamins.// Chemistry of Natural compounds, 2000, №1, p. 37-39

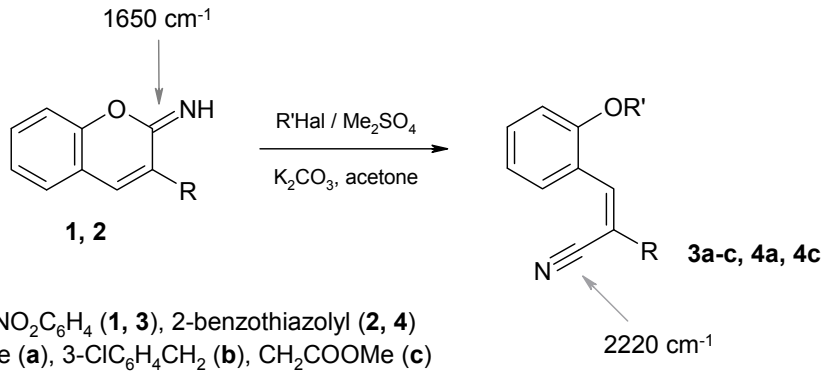
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 3-АРИЛ(ГЕТАРИЛ)-2-ИМИНОКУМАРИНОВ С АЛКИЛИРУЮЩИМИ АГЕНТАМИ

Ищенко В.В., Шаблыкина О.В., Михайлов Н.В., Хиля В.П.

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

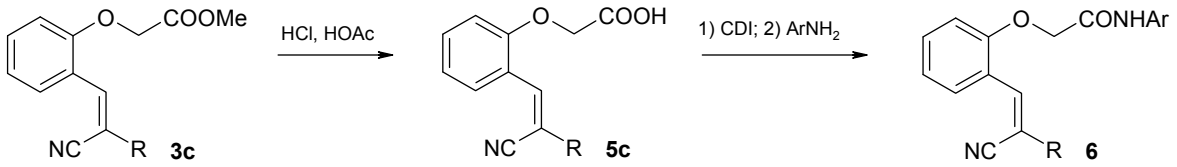
Лабильность пиранового цикла 2-иминокумаринов обуславливает их активность в реакциях с участием нуклеофилов. Взаимодействие 2-иминокумаринов с алкилирующими агентами в зависимости от условий проведения реакции может происходить как О-алкилирование с раскрытием цикла, так и с образованием N-алкил-2-иминокумаринов. Например, алкилирование 2-имино-3-цианокумаринов в водной щелочи диметил(или диэтил)сульфатом приводит к О-алкильным производным 3-(2-гидроксифенил)-2-циано-2-пропенонитрила, хотя при использовании более слабого основания возможно получение N-алкил-2-имино-3-цианокумаринов [1].

Нами установлено, что обработка 2-иминокумаринов **1, 2** с электроноакцепторными арильным или гетарильным заместителями в 3-ем положении кумарина различными алкилирующими агентами даже в мягких условиях (ацетон, поташ) позволяет получить исключительно нециклические продукты **3, 4**, что доказано на основаниии спектров ИК и ^{1}H ЯМР. Реакция проходит быстро и с высоким выходом.



R = 4-$NO_2C_6H_4$ (**1, 3**), 2-benzothiazolyl (**2, 4**)
R' = Me (**a**), 3-$ClC_6H_4CH_2$ (**b**), CH_2COOMe (**c**)

Нитрильная группа в О-алкильных производных **3, 4** стабильна, в частности, в реакции гидролиза сложноэфирной группы вещества **3c** и последующего синтеза амидов **6** на основе кислоты **5c**.



Литература:
1. *И.И. Ткач, А.В. Резниченко, Е.А. Лукьянец* Химия гетероциклических соединений. - 1992, №8. - С.1043.

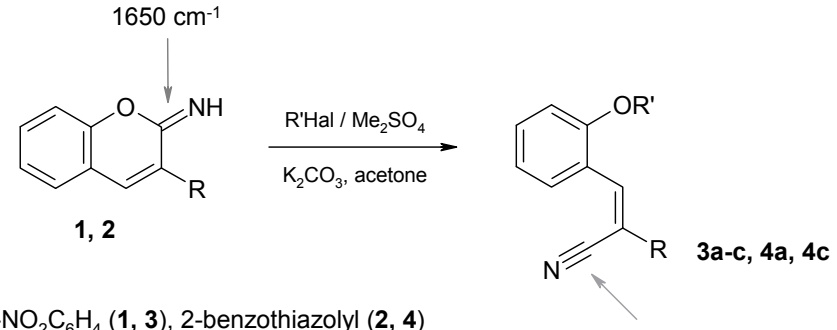
INTERACTION BETWEEN 3-ARYL(HETARYL)-2-IMINOCOUMARINS AND ALKYLATION AGENTS

Ishchenko V.V., Shablykina O.V., Mikhaylov N.V., Khilya V.P.

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

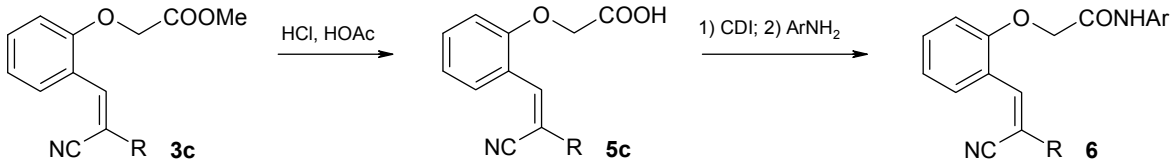
The activity of 2-iminocoumarins in reactions with nucleophiles is caused by the lability of the pyran ring. Depending on the reaction conditions, interaction of 2-iminocoumarins with alkylating agents can occur as O-alkylation ring-opening, and with the formation of N-alkyl-2-iminocoumarins. For example, alkylation of 2-amino-3-cyanocoumarins in aqueous alkali with dimethyl (or diethyl) sulfate leads to the O-alkyl derivatives of 3 (2-hydroxyphenyl)-2-cyano-2-propenonitrile; although the N-alkyl-2-amino-3-cyanocoumarins may be obtained when the using not so strong base [1].

It was founded by us, that treatment of 2-iminocoumarins **1** and **2**, in which there are electrono acceptor aryl or hetaryl substituents in the 3rd position of iminocoumarin ring, with various alkylating agents, even in soft conditions (acetone, K_2CO_3), leads only non-cyclic products **3** and **4**. This process is characterized with high yield and short time of reaction. The structure of substances **3, 4** was proved on the basis of IR and ^{1}H NMR.



R = 4-$NO_2C_6H_4$ (**1, 3**), 2-benzothiazolyl (**2, 4**)
R' = Me (**a**), 3-$ClC_6H_4CH_2$ (**b**), CH_2COOMe (**c**)

Nitrile group in O-alkyl derivatives **3** and **4** is stable, for example, in the hydrolysis of an ester function of substance **3c** and subsequent synthesis of amides **6** based on acid **5c**.



References:
1. *И.И. Ткач, А.В. Резниченко, Е.А. Лукьянец* Химия гетероциклических соединений. - 1992, №8. - С.1043.

МЕТОД СИНТЕЗА ГИБРИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БАРБИТУРОВОЙ КИСЛОТЫ, СОДЕРЖАЩИХ ТЕРПЕНОВЫЕ И ТЕТРАГИДРОХИНОЛИНОВЫЕ ФРАГМЕНТЫ

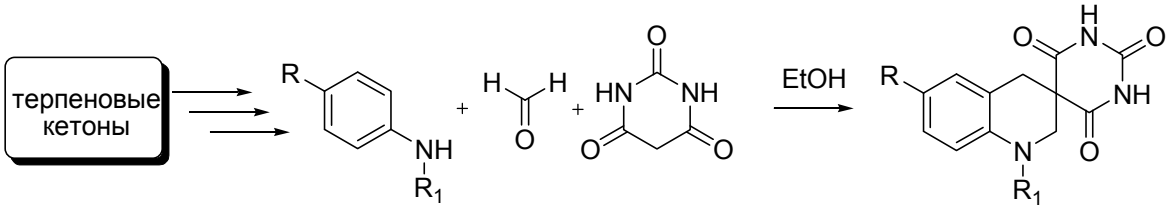
Кадуцкий А.П.

Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: kadutskii@gmail.com

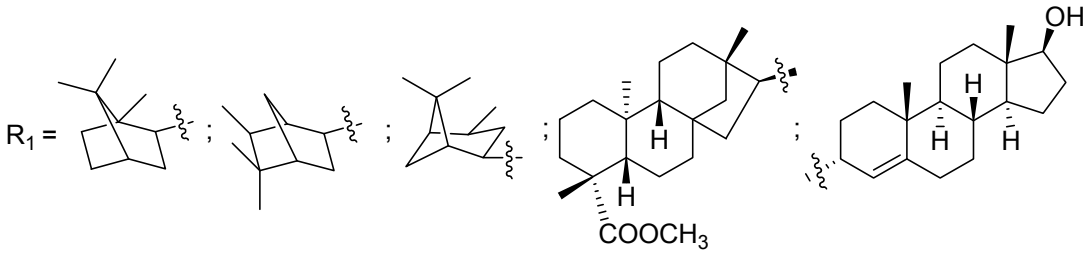
В настоящее время активно развивающимся направлением биоорганической химии является создание гибридных молекул – объектов, сочетающих в своей химической структуре несколько фрагментов, имеющих различные биологические функции и различные активности [1].

Разнообразные производные барбитуровой кислоты находят применение как седативные, местноанальгезирующие, спазмолитические и антиостеопорозисные агенты. Барбитураты также используются в терапии опухолей различного характера [2]. Среди соединений тетрагидрохинолинового ряда найдены фармакологически активные вещества, фунгициды, биоциды, лиганды каталитических систем, красители [3]. Известно, что фармакологические и физикохимические свойства некоторых биологически активных соединений могут быть радикально изменены путем введения в их структуру компактного липофильного фрагмента – например, терпенового заместителя (фенхильного, адамантильного, борнильного) [4].

В данном сообщении мы представляем метод синтеза новых гибридных молекул, содержащих в структуре оновременно три фармакофорных фрагмента – терпеновый, барбитуровой кислоты и 1,2,3,4-тетрагидрохинолина.



R = CH_3 , OCH_3 , $N(CH_3)_2$, N=N–Ar



Синтез осуществляли в две стадии. На первой стадии, восстановительным аминированием доступных кетонов терпенового ряда (камфоры, изокамфанона, вербенона и др.) были получены ариламины с терпеновыми заместителями (**1**). Обработка последних формальдегидом (**2**) и барбитуровой кислотой (**3**) в кипящем этиловом спирте приводила к образованию спиропроизводных барбитуровой кислоты, содержащих терпеновые и тетрагидрохинолиновые фрагменты (**4**).

Литература:

1. *B. Meunier.* // Hybrid molecules with a dual mode of action: dream or reality? - Acc. Chem. Res., 2008, vol. *41*, p. 69-77.
2. *J. T. Bojarski, J. L. Mokrosz, H. J. Barton, M. H. Paluchowska.* // Recent Progress in Barbituric Acid Chemistry - Adv. heterocycl. chem., 1985, vol. 38, p. 229-297.
3. *A. R. Katritzky, S. Rachwal, B. Rachwal.* // Recent progress in the synthesis of 1,2,3,4-tetrahydroquinolines - Tetrahedron, 1996, vol. 52, p. 15031-15070.
4. *R. I. Duclos Jr., D. Lu, J. Guo, A. Makriyannis.* // Synthesis and characterization of 2-substituted bornane pharmacophores for novel cannabinergic ligands - Tetrahedron Letters, 2008, Vol. 49, Iss. 39, p. 5587-5589.

SYNTHESIS OF TETRAHYDROQUINOLINE-BARBITURIC ACID-TERPENE HYBRIDS

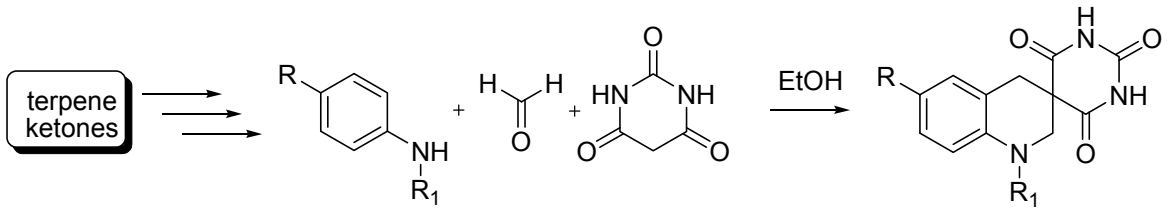
Kadutskii A.P.

Institute of Physical Organic Chemistry, The National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: kadutskii@gmail.com

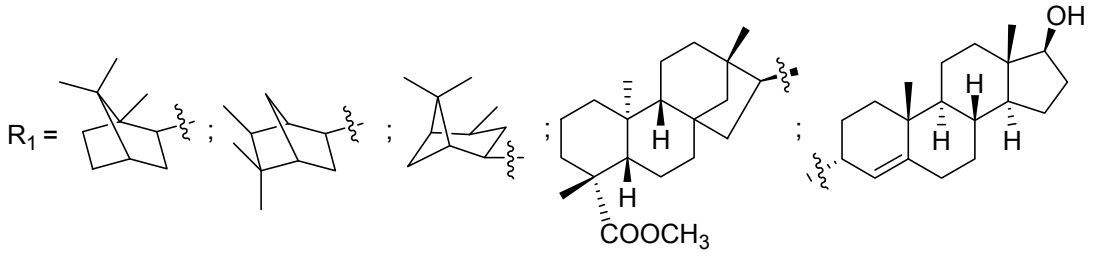
A promising area of modern bioorganic chemistry, awaiting further development, is the creation of hybrid molecules (hybrid molecules are defined as chemical entities with two or more structural domains having different biological functions and dual activity) [1].

Tetrahydroquinoline family compounds are used as a parent compound to make drugs, fungicides, biocides, catalyst ligands and dyes [2]. A large number of barbituric acid derivatives have been widely used as sedative, anticonvulsant and local anaesthetic drugs as well as in antitumor, anticancer and antiosteoporosis treatments [3]. It is known the pharmacological and physicochemical properties of certain drug classes can be modified by incorporating lipophilic moieties such as the terpene backbones (e.g. fenchyl, adamantyl and bornyl groups) [4].

In this context, we report herein our methods for the synthesis of new tetrahydroquinoline-barbituric acid-terpene hybrid molecules.



R = CH_3 , OCH_3 , $N(CH_3)_2$, N=N–Ar



The synthesis includes two steps and starts from readily available terpene ketones, such as camphor, verbanone, etc. They were first converted in the corresponding arylamines **1** by the standard reductive amination protocol. These amines, on treatment with formaldehyde **2** and barbituric acid **3** in refluxing EtOH, undergo spirocyclisation to give the tetrahydroquinoline-barbituric acid-terpene hybrids **4**.

The method allows us to obtain some pharmacologically interesting barbiturates with the mono- and diterpene structural units.

References:

1. *B. Meunier.* // Hybrid molecules with a dual mode of action: dream or reality? - Acc. Chem. Res., 2008, vol. *41*, p. 69-77.
2. *A. R. Katritzky, S. Rachwal, B. Rachwal.* // Recent progress in the synthesis of 1,2,3,4-tetrahydroquinolines - Tetrahedron, 1996, vol. 52, p. 15031-15070.
3. *J. T. Bojarski, J. L. Mokrosz, H. J. Barton, M. H. Paluchowska.* // Recent Progress in Barbituric Acid Chemistry - Adv. heterocycl. chem., 1985, vol. 38, p. 229-297.
4. *R. I. Duclos Jr., D. Lu, J. Guo, A. Makriyannis.* // Synthesis and characterization of 2-substituted bornane pharmacophores for novel cannabinergic ligands - Tetrahedron Letters, 2008, Vol. 49, Iss. 39, p. 5587-5589.

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ ОСТЕО- И ДЕРМОРЕГЕНЕРАЦИИ

[1]Калинкевич О.В., [2]Погорелов М.В., [1]Калинкевич А.Н., [3]Скляр А.М., [1]Данильченко С.Н., [1]Суходуб Л.Ф.

[1]Институт прикладной физики НАН Украины, Сумы, Украина
[2]Медицинский институт Сумского государственного университета, Сумы, Украина
[3]Сумский государственный педагогический университет, Сумы, Украина
e-mail: kalinkevich@gmail.com

В травматологии и ортопедии существует постоянная потребность в использовании костных имплантантов при повреждении костно-суставной системы. Ежегодно в мире осуществляется около 4 миллионов операций с использованием костных имплантатов, при этом активно разрабатывается широкий спектр различных биоматериалов для клинического использования. Методы ауто- и аллотрансплантации имеют ряд серьезных недостатков (потеря крови, продолжительность госпитализации, ограничения в объеме, быстрая биодеградация в случае аутокости, медленная остеоинтеграция, риск бактериальной или вирусной инфекции, возможность развития реакции гистонесовместимости в случае алло кости). Синтетические костные имплантаты в виде материалов из керамики, коллагеновых и не коллагеновых белков, биоактивного стекла и полимеров используют в 10% случаев при замещении костных дефектов.

Наша работа направлена на создание и комплексную характеризацию материалов на основе хитозана для замещения костных и кожных дефектов. Композиционные материалы на основе кальций-фосфатов и биополимера хитозана в сравнении с другими имеют уникальные свойства. По своему строению они близки к костной ткани человека и индуцируют биологические реакции, подобные протекающим при ремоделировании кости. Во время резорбции продукты деградации хитозана и кальций-фосфатов (ионы кальция, фосфаты, глюкозамины) естественно метаболизируются и не вызывают повышения уровня кальция и фосфора в моче, сыворотке крови или внутренних органах. Материал содержит как макро-, так и микропоры, а также наноразмерные кристаллы гидроксилапатита, что оказывает содействие увеличению реактивной поверхности и остеоиндуцирующей активности материала. Скорость спонтанного химического растворения кальций фосфатных материалов не превышает скорости репреципитации биологического апатита на поверхности имплантата. Характеристики материала и мягкие условия синтеза дают возможность иммобилизировать лекарственные препараты, антибиотики, ферменты, клетки. В нашей работе получены композиты, содержащие наночастицы серебра, магнетита, оксида титана, оксида циркония, кремнезем, аскорбиновую кислоту, каротин, витамины В12 и К, антибиотики – рифампицин, линкомицин, цефтриаксион метронидазол. Варьирование содержания влаги в образце до лиофильного высушивания дает возможность контролировать пористость материала. Введения в состав материала хитина дает возможность улучшить механические характеристики и регулировать резорбцию – потенциально композиты могут быть рассчитаны на разные сроки резорбции.

Важным направлением наших работ является создание материалов для кожной пластики. В работе проведены *in vivo* тесты геля на основе хитозану и с добавлением мирамистина, метилурацила и аскорбиновой кислоты при лечении глубоких ожогов кожи. Для получения модифицированных гелей в раствор прибавляли вышеупомянутые вещества в соответствующих концентрациях. Исследования in-vivo проведены на лабораторных крысах-самцах с моделированными ожогами IIB степени, которые были рандомизованы в контрольную и экспериментальную группы. Последней с 3-х суток после нанесения ожога дважды в сутки проводили обработку раневой поверхности разными модификациями гелей на основе хитозана. Гистологическое исследование показало уменьшение воспалительной реакции и отека в биоптатах, ускорения эпителизации поверхности травмы и сокращения сроков заживления дефекта на 2-3 суток. Микробиологические исследования обнаружили высокое бактериостатическое действие геля в отношении большинства представителей микрофлоры ожоговой поверхности, что позволило избегнуть инфекционных осложнений. Получены пленочные покрытия на основе ацетата и аскорбата хитозана с включением наночастиц серебра, а также геля иодида хитозана между пленками различной толщины. Разработки проходят стадию пред клинического испытания.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN-BASED BIOMATERIALS FOR BONE AND SKIN REGENERATION

[1]Kalinkevich O.V., [2]Pogorelov M. V., [1]Kalinkevich A. N., [3]Sklyar A.M., [1]Danilchenko S.N., [1]Sukhodub L.F.

[1]Institute for Applied physics, Sumy, Ukraine
[2]Medical Institute of Sumy State University, Sumy, Ukraine
[3]Sumy State pedagogical University, Sumy, Ukraine
e-mail: kalinkevich@gmail.com

Every year about 4 million operations are made all over the world, in which bone implants are used. In most cases, auto- and allotransplantation techniques are used. At the same time, these techniques have quite a number of serious disadvantages: blood loss, long term of hospitalization, size limitation, too rapid biodegradation in the case of autogenous bone grafts, slow osteointegration, bacterial or viral infection risks, hazard of histoincompatibility in the case of bone allografts. Synthetic bone implants made of ceramics, collagen and non-collagenous proteins, bioactive glass and polymers are used in 10% of cases of bone defects replacement.

Our work is dedicated to the development and comprehensive characterization of chitosan-based materials for bone and skin defects replacement. Composite materials based on calcium phosphates and chitosan have unique properties compared with others. They induce biological reactions similar to the reactions taking place during bone remodeling. In the course of resorption, the products of chitosan and calcium phosphate degradation are metabolized naturally and do not induce an increase of calcium or phosphorus level in urine, blood serum or viscera. The material contains both macro- and micropores, and nanosized crystals of hydroxyapatite, increasing the reactive surface and ostoinductive activity of the material. The rate of spontaneous chemical dissolution of calcium phosphate is not higher than the reprecipitation rate of the biological apatite onto the surface of implants. In our laboratory a series of composites have been obtained containing metal and oxide nanoparticles or biologically active substances. Changing water content in a sample before lyophilization one can control the porosity of materials. Incorporation of chitin into the material gives possibility to improve its mechanical characteristics and regulate the terms of resorption: potentially composites can be adjusted to certain resorption times. Mechanically strong dense materials were obtained by addition chitin fibers to stock solution.

Another part of our work was the development of materials for skin grafting. In vivo test of chitosan-based gels have been performed for treatment of deep skin burns. The in vivo tests were performed using laboratory rats with model burns, which had been randomized in the control and experimental groups. Histological study has shown the decrease of inflammatory reaction and edema in biopsy material, acceleration of wound surface epithelization, and shortening of healing time by 2-3 days. Microbiological tests have shown the strong bacteriostatic effect of the gel towards the majority of species of burn surface microflora, which allowed to avoid infectious complications. The film-shaped coatings on the basis of chitosan acetate and chitosan ascorbate with incorporated silver nanoparticles have been obtained, along with “sandwich” coatings of chitosan iodide gel between chitosan films with different thickness. The materials are now on the stage of pre-clinical tests.

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 5-АМИНО-4-АЦИЛАМИНО-1*H*-ПИРАЗОЛА В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ ФУРИНА

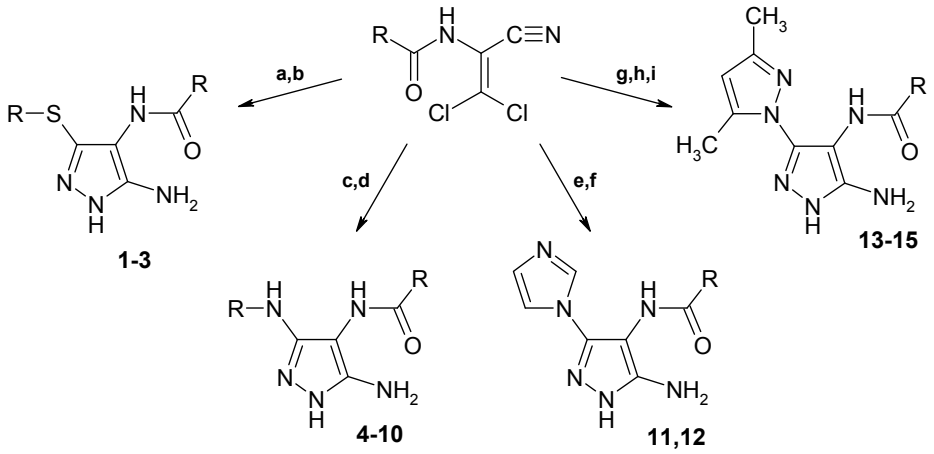
[1]Кибирев В.К., [1]Осадчук Т.В., [2]Вадзюк О.Б., [1]Шаблыкин О.В., [1]Козаченко А.П., [1]Чумаченко С.А., [1]Попильниченко С.В,. [1]Броварец В.С.

[1]Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: kibirev@bpci.kiev.ua
[2]Институт биохимии им. А.В.Палладина НАН Украины, Киев, Украина

Фурин (КФ 3.4.21.75) – кальций-зависимая внутриклеточная сериновая эндопротеаза животных, относящаяся к семейству пропротеинконвертаз, гомологична с субтилизином бактерий. Благодаря ограниченному расщеплению различных предшественников секретируемых белков по пептидной связи, расположенной после пары положительно заряженных остатков аминокислот (-Arg-Arg- или -Lys-Arg-) на участке с кластером основных аминокислот: -Arg-X-Lys/Arg-Arg-↓, фермент выполняет важные функции. Он играет первостепенную роль не только в нормальных физиологических процессах, но ответственен также за развитие многих вирусных и бактериальных заболеваний и таких патологий, как опухоли, нейродегенеративные нарушения и диабет. Поэтому фурин рассматривают как важную мишень для синтеза соответствующих ингибиторов и создания на их основе новых лекарственных препаратов.

Ранее было обнаружено, что некоторые пиразолы подавляют активность фурина [1]. Целью настоящей работы является синтез ряда 5-амино-4-ациламино-1*H*-пиразола и исследование взаимосвязи между их строением и эффективностью ингибирующего действия на фурин.

Синтез новых соединений осуществляли по следующей схеме:



Условия: **1-3 a)** RSH, Et_3N, MeCN, 20-25^{0}C, 6ч; **b)** $N_2H_4{\cdot}H_2O$, EtOH, 80^{0}C, 2ч;
4-10 c) RNH_2, ДМФА, 20-25^{0}C, 100; **d)** $N_2H_4{\cdot}H_2O$, $(CH_2)_2(OH)_2$, 160^{0}C, 3ч;
11,12 e) имидазол, THF, 70^{0}C, 8ч; **f)** $N_2H_4{\cdot}H_2O$, THF, 70^{0}C, 6ч;
13-15 g) $N_2H_4{\cdot}H_2O$, EtOH, 20-25^{0}C, 6ч; **h)** $(CH_3CO)_2CH_2$, EtOH, 80^{0}C, 2ч;
i) $N_2H_4{\cdot}H_2O$, EtOH, 80^{0}C, 5ч.

Скрининг этих производных в качестве ингибиторов фурина осуществляли при pH 7,2 и температуре 37ºC с использованием флуорогенного субстрата Boc-Arg-Arg-Val-Arg-AMC. Было найдено, что наиболее эффективными ингибиторами являются пиразолы, содержащие в 4-ом положении гетероцикла ациламиногруппу небольшого объема, а в 3-ем положении – заместитель с гидрофобными группировками.

Построение графика Лайнуивера-Берка показало, что самое активное соединение - 5-амино-4-ацетиламино-3-(4-метилфениламино)-1*H*-пиразол - тормозит ферментативную реакцию по механизму смешанного ингибирования (Ki=288 мкМ). Эти результаты позволяют наметить пути химической модификации структуры 5-амино-1*H*-пиразолов для создания более мощных ингибиторов фурина непептидной природы.

Литература:

1.*Komiyama T., Coppola J.M., Larsen M.J. van Dort M.E., Ross B.D., Day R., Rehemtulla A., Fuller R.S.* // Inhibition of furin/proprotein convertase-catalyzed surface and intracellular processing by small molecules - J. Biol. Chem., 2009, vol. 284, N 23, p. 15729-15738.

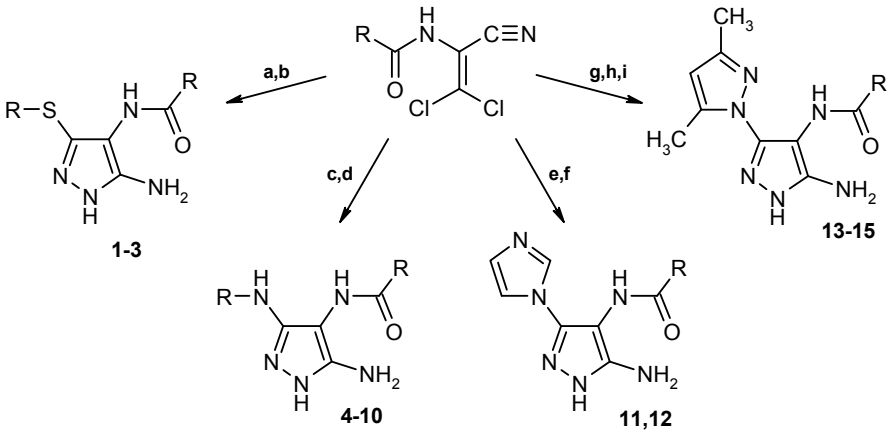
SYNTHESIS AND STUDY ON DERIVATIVES OF 5-AMINO-4-ACYLAMINO-1*H*-PYRAZOLE AS INHIBITORS OF FURIN

[1]Kibirev V.K., [1]Osadchuk T.V., [2]Vadzyuk O.B., [1]Shablykin O.V., [1]Kozachenko O.P., [1]Chumachenko S.A., [1]Popilnichenko S.V., [1]Brovarets V.S.

[1]Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: kibirev@bpci.kiev.ua
[2]Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine, Ukraine

Furin (EC 3.4.21.75) is Ca^{2+}-dependent intracellular mammalian serine endoprotease belonging to subtilisin-like family of proprotein convertases. Due to limited cleavage of peptide bonds of many precursors of secreted proteins after pairs of basic amino acids -Arg-Arg- or -Lys-Arg- at the claster of multibasic motif –Arg-X-Lys/Arg-Arg-↓ this enzyme performs important functions. It involves not only in normal physiological processes but is also responsible for diverse bacterial and viral diseases, tumorigenesis, neurodegenerative disorders and diabetes. Therefore it is regarded as important target for synthetic inhibitors and novel drugs.

It was found previously that some pyrazoles retarded activity of furin [1]. The goal of our work was synthesis of some derivatives of 5-amino-4-acylamino-1*H*-pyrazole and study on relationship between their structure and power of their furin inhibition. Synthesis of novel compounds was accomplished in accordance with such a scheme:



Conditions: **1-3 a)** RSH, Et_3N, MeCN, 20-25^{0}C, 6h; **b)** $N_2H_4{\cdot}H_2O$, EtOH, 80^{0}C, 2h;
4-10 c) RNH_2, DMF, 20-25^{0}C, 100h; **d)** $N_2H_4{\cdot}H_2O$, $(CH_2)_2(OH)_2$, 160^{0}C, 3h;
11,12 e) imidazole, THF, 70^{0}C, 8h; **f)** $N_2H_4{\cdot}H_2O$, THF, 70^{0}C, 6h;
13-15 g) $N_2H_4{\cdot}H_2O$, EtOH, 20-25^{0}C, 6h; **h)** $(CH_3CO)_2CH_2$, EtOH, 80^{0}C, 2h;
i) $N_2H_4{\cdot}H_2O$, EtOH, 80^{0}C, 5h.

Screening these compounds as inhibitors of furin was carried out at pH 7.2 and temperature 37ºC with fluorogenic substrate Boc-Arg-Arg-Val-Arg-AMC. It was shown that the most effective inhibitors were pyrazoles containing a small acylamino group at C4-position of the rings and a hydrophobic substituent at C3-position. The fitting of obtained data into Lineweaver - Burk plot showed that the most potent compound - 5-amino-4-acetylamino-3-(4-methylphenylamino)-1*H*-pyrazole – retarded the enzymatic reaction by mixed-type mechanism of inhibition with Ki = 288 μM.

These findings permit to plan new ways for chemical modifications of the 5-amino-1*H*-pyrazole structure and design more potent furin inhibitors of non-peptide nature.

References:

1. *Komiyama T., Coppola J.M., Larsen M.J. van Dort M.E., Ross B.D., Day R., Rehemtulla A., Fuller R.S.* // Inhibition of furin/proprotein convertase-catalyzed surface and intracellular processing by small molecules - J. Biol. Chem., 2009, vol. 284, N 23, p. 15729-15738.

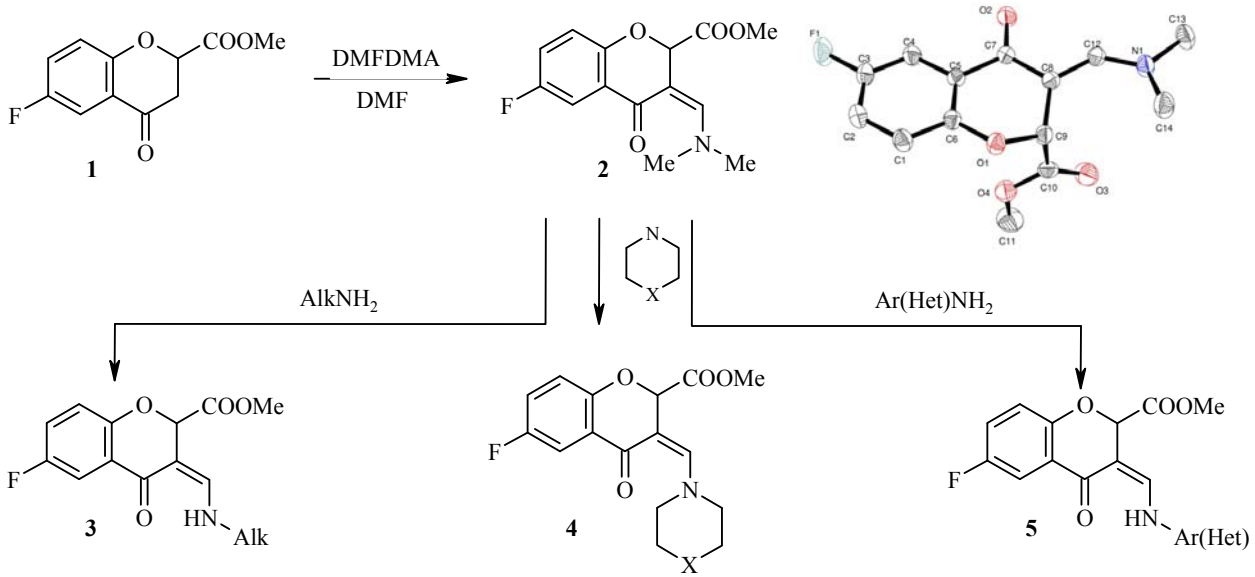
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕТИЛ 3-[(ДИМЕТИЛАМИНО)МЕТИЛЕН]-3,4-ДИГИДРО-4-ОКСО-6-ФТОР-2*H*-ХРОМАН-2-КАРБОКСИЛАТА С ПЕРВИЧНЫМИ И ВТОРИЧНЫМИ АМИНАМИ

[1] Кисель А.И., [1]Москвина В.С., [1]Войтенко З.В., [2]André C., [1]Хиля В.П.

[1]Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина
e-mail: v.moskvina@gmail.com
[2] Université Paul Sabatier, France

Интерес к производным хроманов (3,4-дигидро-2*H*-1-бензопиранов) – важнейших кислородсодержащих гетероциклов – обусловлен рядом факторов. Соединения данного класса активно представлены в растительном мире, обладают широким спектром биологической активности и применяются в медицинской практике. Высокая реакционная способность этих соединений делает их привлекательными объектами синтетической органической химии.

Нами впервые получен метил 3-[(диметиламино)метилен]-3,4-дигидро-4-оксо-6-фтор-2*H*-хроман-2-карбоксилат (**2**) с высоким выходом при взаимодействии метил 3,4-дигидро-4-оксо-6-фтор-2*H*-хроман-2-карбоксилата (**1**) с *DMFDMA* в диметилформамиде.



Соединение **2** в последующем было нами использовано в реакциях с различными алифатическими первичными и вторичными аминами, а также ароматическими и гетероциклическими аминами с целью получения потенциальных биологически активных веществ, поскольку известно, что введение в структуру молекулы остатков вторичного или третичного амина часто приводит к получению соединений с новыми типами структур, перспективных для медицины.

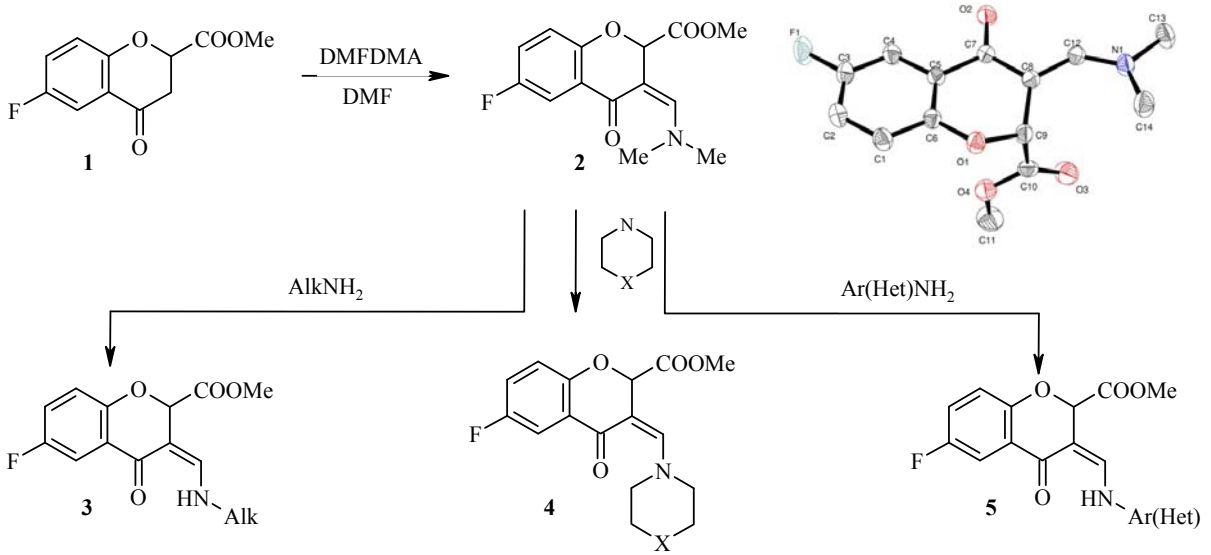
REACTION OF METHYL 3-[(DIMETHYLAMINO)METHYLENE]-3,4-DIHYDRO-6-FLUORO-4-OXO-2*H*-CHROMAN-2-CARBOXYLATE WITH PRIMARY AND SECONDARY AMINES

[1]Kysil A.I., [1]Moskvina V.S., [1]Voitenko Z.V., [2]André C., [1]Khilya V.P.

[1]Taras Shevchenko National University of Kiev, Kiev, Ukraine
e-mail: v.moskvina@gmail.com
[2]Université Paul Sabatier, France

Derivatives of chroman (3,4-dihydro-2*H*-1-benzopyran) constitute a major class of oxygen-containing heterocycles and attract significant interest due to several reasons: they are actively represented in the plant kingdom, possess a wide spectrum of biological activity, and are employed in medical practice. Their high reactivity makes them attractive targets for synthetic organic chemistry.

We have obtained in high yield a novel methyl 3-[(dimethylamino)methylene-3,4-dihydro-6-fluoro-4-oxo-2*H*-chroman-2-carboxylate (**2**) via a reaction of methyl 3,4-dihydro-6-fluoro-4-oxo-2*H*-chroman-2-carboxylate (**1**) with DMFDMA in dimethylformamide.



Adding a residue of a secondary or tertiary amine to a molecule frequently leads to new compounds with prospects for medical use. Based on this assumption, we then introduced the compounds **2** into reactions with different primary and secondary aliphatic amines, aromatic and heterocyclic amines in order to obtain potentially biologically active compounds.

СИНТЕЗ С-Р АНАЛОГОВ О-ФОСФО-СЕРИНА – КЛЮЧЕВОГО ЗВЕНА ФОСФАТИДИЛСЕРИНА

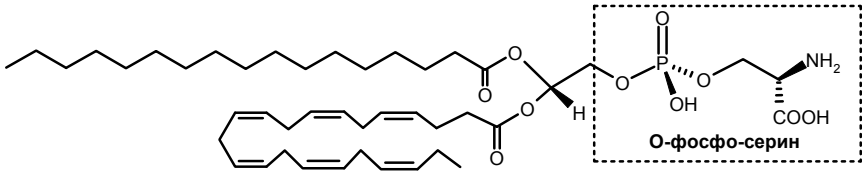
Колодяжна О.О., Колодяжный О.И.

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: olegkol321@rambler.ru

С-Р Изостеры природных фосфорсодержащих биомолекул вызывает большой интерес в связи с тем, что обладают высокой биологической активностью и являются полезными субстратами при исследованиях физиологических процессов фосфорилирования.

Настоящая работа посвящена синтезу С-Р аналогов фосфатидилсерина (ФС), который является важным природным биофосфатом, составляет около 10% липидов всех нейронных клеток, причем в человеческом организме содержится около 60 г ФС, из них 30 г находится в головном мозге. ФС играет ключевую физиологическую роль в дифференцировании нейронов, процессах активации, регенерации и синтеза нейромедиаторов (ацетилхолина и др.). ФС регулируют нервные процессы, в том числе, процессы деления и роста нервных клеток. Он препятствует разрушению клеток головного мозга микрофагами, подавляя их фагоцитарную активность

ФС - важный фармпрепарат. Он используется для лечения болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона, возрастного снижения умственных функций, улучшает процесс мышления и дефицит внимания (ADHD) у молодых людей, предотвращает стрессы, депрессию, повышает спортивные результаты [1,2]

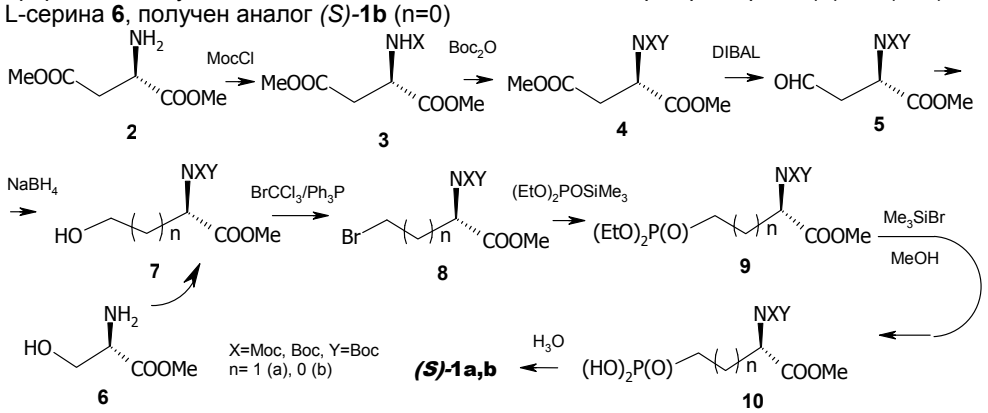


Фосфатидилсерин

(*S*)-1a **(*S*)-1b**

С-Р Аналог фосфо-серина, 1a,b

Нами разработан метод синтеза С-Р-аналога О-фосфо-серина (ключевого звена фосфатидилсерина) **1** исходя из NBoc защищенного диметиласпартата **2**, X,Y =Moc или Boc, а затем полученное соединение **4** восстановили с помощью реагента ДИБАЛЬ с образованием альдегида **5**, который далее довосстановили боргидридом натрия в ТГФ, что привело к образованию N-защищенного гомосериналя **7**. Получить это соединение, минуя стадию образования альдегида **5** не удается, так как получается смесь соединений. Затем спирт **7** при помощи реакции Аппеля превратили в бромид **8**, который ввели в реакцию Арбузова, что привело к образованию соединения **9**. После депротекции атома азота и гидролиза эфирных групп у атома фосфора был получен оптически активный С-Р аналог О-фосфо-серина *(S)*-**1a** (n=1). Аналогично, исходя из L-серина **6**, получен аналог *(S)*-**1b** (n=0)



Литература

1. *Crook, T. H.; R. M. Klatz //* Treatment of Age-Related Cognitive Decline: Effects of Phosphatidylserine in Anti-Aging Medical Therapeutics. Chicago: Health Quest Publications. 1998, pp.20–29.
2. *Hoffmann PR, Kench J.A, Vondracek A. //* Interaction between Phosphatidylserine and the Phosphatidylserine Receptor Inhibits Immune Responses In Vivo - J. Immunol. 2005, vol. 174, p. 1393-1404.

SYNTHESIS OF C-P ANALOGUES OF O-PHOSPHOSERINE – KEY MOLECULAR FRAGMENT OF PHOSPHATIDYLSERINE

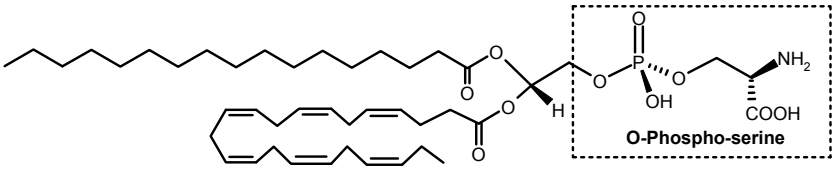
Kolodiazhna O.O., Kolodiazhnyi O.I.

Institute of bioorganic chemistry and petrochemistry NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: olegkol321@rambler.ru

The synthesis of C-P isosters of naturally occurring phosphorylated biomolecules has become of interest with the recognition that these compounds possess high biological activity. Moreover they are useful substrates in the study of phosphorylation-based physiological processes.

The present work is devoted to the synthesis of C-P isosteric derivatives of phosphatidylserine (PS) which is important natural biophosphate. The PS is found in the cell membrane of neurons, comprising about 10 mol.% of the total phospholipids in the plasma membrane. The total amount of PS in the human body is about 60 grams, 30 grams of which is in the brain. PS plays a key physiological role in differentiation of neurones, processes of activation, neogenesis and synthesis of neuromediators (acetylcholine, etc.). PS is the most abundant negatively charged phospholipid in eukaryotic membranes.

Phosphatidylserine is important pharmaceutical means, It is used for the treatment of Alzheimer's and Parkinson's disease, age-related decline in mental function, improving thinking skills, deficit-hyperactivity disorder (ADHD), psychologic stress, mental depression, improves athletic performance [1,2].

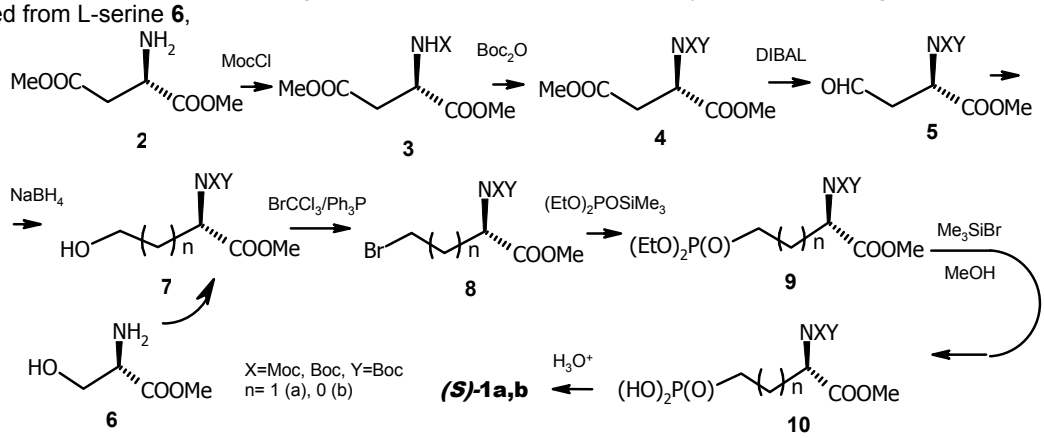


Phosphatidylserine

(*S*)-1a **(*S*)-1b**

C-P analogues of phospho-serine, 1a,b

We have developed a method for the synthesis of phosphonates **1a,b,** that are C-P-analogues of O-PhosphoSerine (a key fragment of phosphatidylserine) starting from NBoc protected dimethyl aspartate **2**, X, Y =Moc or Boc. Then the synthesized compound **4** was reduced by DIBAL with formation of aldehyde **5** which further was reduced by sodium borohydride in ТГФ with formation of N-protected homoserinal **7**. The attempt to prepare the compound **7** directly from diether **4** omitting the formation of aldehyde **5** was unsuccessful. Then the alcohol **7** by Appell reaction was converted into bromide **8** which reacted with diethyl trimethylsilyl phosphite with formation of phosphonate **9**. Deprotection of nitrogen and hydrolysis of diethoxy groups in compound **9** resulted in the formation of phosphonic analogue of O-phosphoserine **1**. Similarly, the C-P analogue *(S)*-**1b** (n=0) was prepared from L-serine **6**,



References:

1. *Crook, T. H.; R. M. Klatz* // Treatment of Age-Related Cognitive Decline: Effects of Phosphatidylserine in Anti-Aging Medical Therapeutics. **2**. Chicago: Health Quest Publications. 1998, pp.20–29.
2. *Hoffmann PR, Kench J.A, Vondracek A.* // Interaction between Phosphatidylserine and the Phosphatidylserine Receptor Inhibits Immune Responses In Vivo - J. Immunol. 2005, vol. 174, p. 1393-1404.

СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ 1,3-ТИАЗОЛА - ПЕРСПЕКТИВНЫХ БАВ

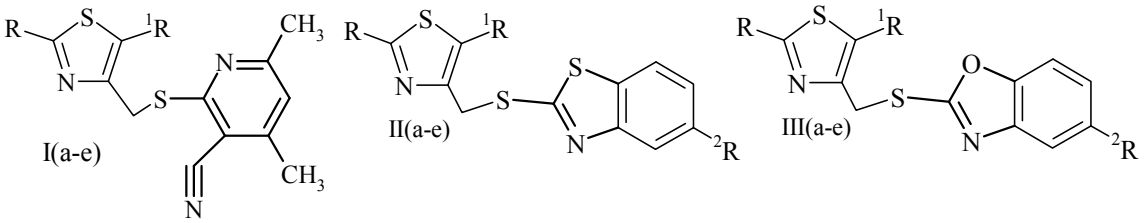
Коваленко Н., Цапко М., Шишкина Е.

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

Тиазольное кольцо встречается в соединениях распространеных в природе и стоящих в первых рядах важности для живых систем, например, витамин B_1 и пенициллин [1]. Производными тиазола являеться ряд лекарственних препаратов: например, аналептическое средство амифеназол, феноклозиновая кислота, которая является активным антипиретиком с анальгетическими свойствами, препарат клометиазол имеет седативное, гипнотическое и антиконвульсативное действие [2-4], лекарственные препараты фамотидин [5], цефалоспорин [6] и другие. В связи с этим получение и исследование новых производных тиазола является актуальным.

Реакция 1,3-дибромацетона с тиоацетамидом, тиобензамидом, тиомочевиною и производными α-цианотиоацетомида по его цианометильной группе ведет к образованию тиазолов с активной бромометильной группой в четвертом положении 1,3-тиазольного ядра, которая позволяет синтезировать ряд производных, содержащих фармакоформные заместители в этом положении

Компьютерное моделирование соединений **I, II, III(a-e)** по видам фармакологического действия, проведенный по программе PASS, показало, что эти соединения целесообразно проверять их на наличие противовоспалительной, антиишемической, противоязвенной, а также гепатотоксической функций.



(a)R=CH_3, ^{1}R=H ; (b)R=Ph, ^{1}R=H ; (c) R= CN-C-[CH-Ph-4'-OH-3'-OCH_3), ^{1}R=H;
(d) R= CN-C-[CH-Ph-4'-$N(CH_3)_2$] , ^{1}R=H; (f) R= CN-C-[CH-Ph-4'-OH-3'-OCH_3), ^{1}R=Br;
(e) R= CN-C-[CH-Ph-4'-$N(CH_3)_2$] , ^{1}R=Br; (g) R= CN-C-[CH-Ph) , ^{1}R=Br;
(j)R=Ph, ^{1}R=Br ; (h) R= CN-C-[CH-Ph) , ^{1}R=H;
(i) R= CH_2CN , ^{1}R=Br;

Литература:
1. *М.Д. Машковский.* // Лекарственные средства, ч 1,2., Москва, медицина, 1998г.
2. *P. Lyden; M. Jacoby; J. Schim; G. Albers; P. Mazzeo; Ashwood; A Nordlund; T. Odergren.* // The Clomethiazole Acute Stroke Study in tissue-type plasminogen activator-treated T stroke (CLASS-T) final results – Neurology, 2001, vol. 57, № 7, 1199-1205.
3. *Martin Bernard Keat* // GB831873, 1960-04-06
4. *A. Shulman.* // A Possible Mode of Action of 2: // 4-Diamino-5-phenyl-thiazole Hydrochloride (Daptazole or Amiphenazole) - Nature 177, 703 (14 April 1956); doi:10.1038 / 177703a0,
5. *Bod, P., Harsanyi.* // *Austrian AT 389,510.* Chem. Abstr. *113:59163 k..* – 1984, *3*, 649.
6. *M Mamsuo; R. Manabe* // JP 01.79.178 Chem. Abstr. 111:153790 t. 1994, *29*, 339.

SYNTHESIS OF DERIVATIVES OF 1,3-THIAZOLES - PERSPECTIVE BAS

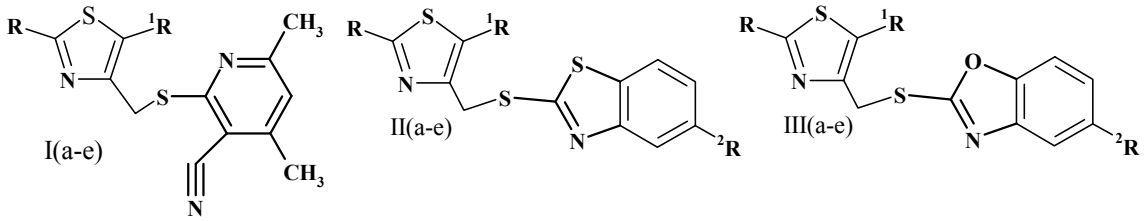
Kovalenko N., Tsapko M., Shyshkina O.

Kyiv Taras Shevchenko University, Kyiv, Ukraine
e-mail: tsapko@univ.kiev.ua

Thiazole's ring is contained in nature compounds and play an important role for the living systems, for example, vitamin B1 and penicilline [1]. Some medicines are also the derivatives of thiazoles, for example, amifenazol; clomethiazole [2-4], medicinal preparations of famotidine [5], cephalosporin [6] et al. Synthesis and investigation of new thiazole's derivatives is actual because of high biological activity.

Interaction of 1,3-dibromacetone with thioacetamides, thiobenzamides, thiourea and derivatives of α-cianothioacetamides lead to formation of thiazoles with an active bromomethyl group in 4 position of 1,3- thiazole ring. This allows to synthesize the number of derivatives containing farmactive substituents in this position.

Antiinflammator, antiischemic, antiulcerative and hepatotoxic activities and perspectives for investigations *in vitro* of the compounds **6a-c** and **7a-c** have been shown using the program PASS.



(a)R=CH_3, ^{1}R=H ; (b)R=Ph, ^{1}R=H;
(c) R= CN-C-[CH-Ph-4'-OH-3'-OCH_3), ^{1}R=H;
(d) R= CN-C-[CH-Ph-4'-N$(CH_3)_2$], ^{1}R=H;
(f) R= CN-C-[CH-Ph-4'-OH-3'-OCH_3), ^{1}R=Br;
(e) R= CN-C-[CH-Ph-4'-N$(CH_3)_2$], ^{1}R=Br;
(g) R= CN-C-[CH-Ph), ^{1}R=Br;
(j)R=Ph, ^{1}R=Br;
(h) R= CN-C-[CH-Ph), ^{1}R=H;
(i) R= CH_2CN, ^{1}R=Br;

References:

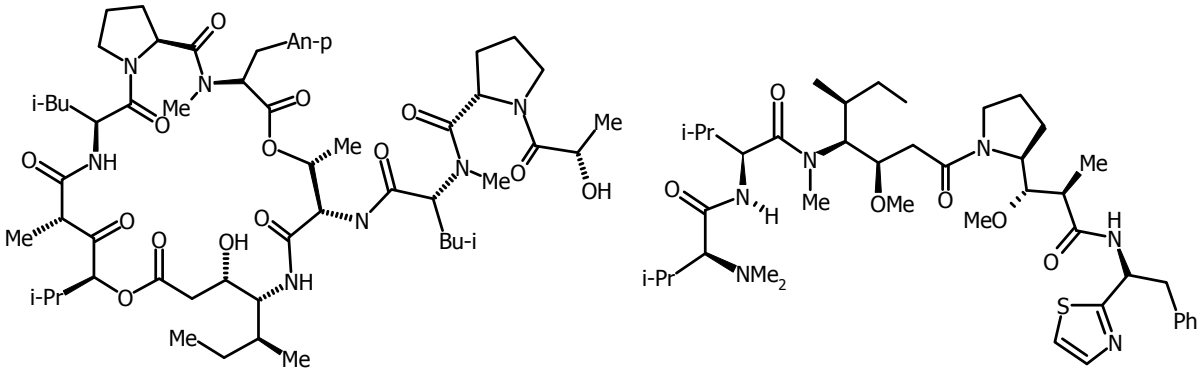
1. *М.Д. Машковский.* // Лекарственные средства, ч 1,2., Москва, медицина, 1998г.
2. *P. Lyden; M. Jacoby; J. Schim; G. Albers; P. Mazzeo; Ashwood; A Nordlund; T. Odergren.* // The Clomethiazole Acute Stroke Study in tissue-type plasminogen activator-treated T stroke (CLASS-T) final results – Neurology, 2001, vol. 57, № 7, 1199-1205.
3. *Martin Bernard Keat* // GB831873, 1960-04-06
4. *A. Shulman.* // A Possible Mode of Action of 2: // 4-Diamino-5-phenyl-thiazole Hydrochloride (Daptazole or Amiphenazole) - Nature 177, 703 (14 April 1956); doi:10.1038 / 177703a0,
5. *Bod, P., Harsanyi. // Austrian AT 389,510. Chem. Abstr. 113:59163 k..* – 1984, *3*, 649.
6. *M Mamsuo; R. Manabe // JP 01.79.178 Chem. Abstr. 111:153790 t.* 1994, *29*, 339.

ФОСФОРНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ДИДЕМНИНА И ДОЛАСТАТИНА -ПРИРОДНЫХ АНТИРАКОВЫХ ВЕЩЕСТВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ

Колодяжный О.И., Колодяжная О.О.

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: olegkol321@rambler.ru

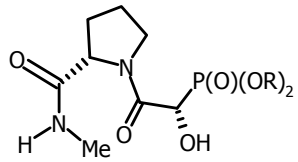
Дидемнин Б и Доластатин 11,–одни из наиболее активных антираковых препаратов, выделены недавно из морских организмом. Дидемнины были выделены из туниката Карибского моря *Trididemnum Solidum*, а Доластатин 11 - из моллюска морского зайца *Dolabella auricularia.* Дидемнин Б обладает высокой антиопухолевой, антивирусной, иммунодепрессантной активностью. Он эффективен при лечении лейкемии P388 и L1210, меланом B16. Дидемнины обладают антивирусной активностью против ДНК и РНК вирусов. Установлено, что дидемнин В присоединяется к узлу Nb2 в клетках лимфомы и это присоединенние активирует иммунодепрессантную активность. Цитотоксичность Доластатина 11 определена разрушением микрофиламен и возбуждением полимеризации актина [1,2].



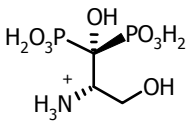
Didemnin b Dolastatin 11

Схема 1. Дидемнин Б (слева); б) Доластатин 11 (справа)

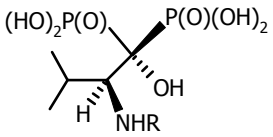
К сожалению Дидемнин и, в некоторой степени, Доластатин обладают повышенной токсичностью и низкой растворимостью. Одним из возможных путей уменьшения токсичности антираковых препаратов является их фосфорная модификация. С этой целью мы синтезированы хиральные синтетические блоки **1-6**, предназначенные для их последующего введения в структуру Дидемнина Б и Доластатина 11. Синтез соединений осуществлен, исходя из природных аминокислот. Структура и стереохимическая чистота соединений **1-6** изучены физико-химическими методами.



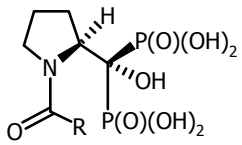
1



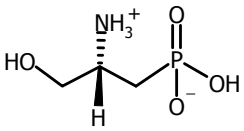
2



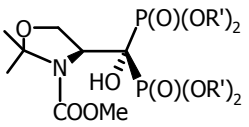
3



4



5



6

Литература:

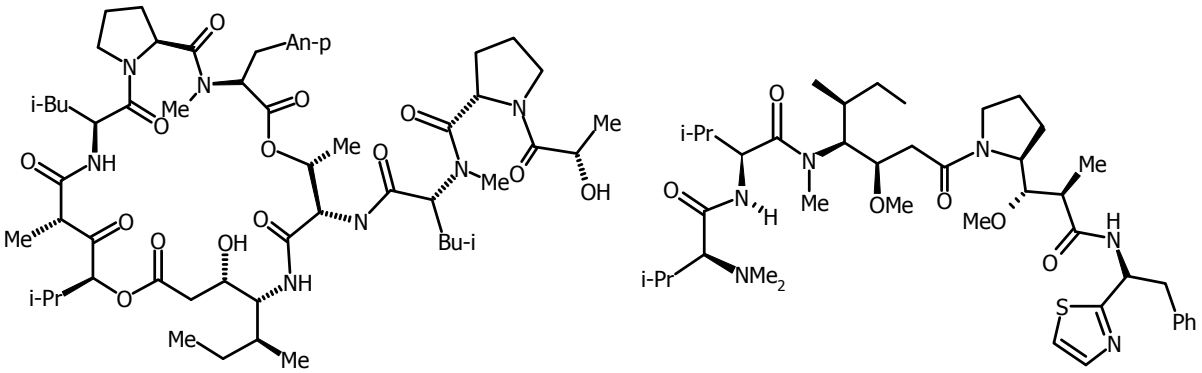
1. *A Losada, J.M. Lopez-Oliva, J.M. Sanchez-Puelles, L.F. Garcıa-Fernandez*// Establishment and characterisation of a human carcinoma cell line with acquired resistance to Aplidin - British Journal of Cancer, 2004, Vol. 91, P. 1405-1413.
2. *D.J. Newman, G.M. Cragg*// Advanced Preclinical and Clinical Trials of Natural Products and Related Compounds from Marine Sources - Current Medicinal Chemistry, 2004, Vol. 11, P. 1693-1713.

PHOSPHONIC MODIFICATION OF DIDEMNIN B AND DOLASTATIN 11 - NATURAL ANTICANCER DRUGS ISOLATED FROM SEA ORGANISMS

Kolodiazhnyi O. I., Kolodiazhna O. O.

Institute of Bioorganic chemistry and Petrochemistry, NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: olegkol321@rambler.ru

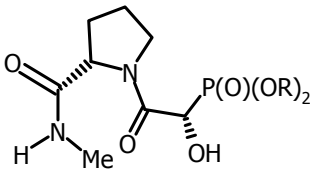
Didemnin B and Dolastatin 11 are the most active anticancer drugs, isolated from sea organisms, Didemnin B was isolated from Caribbean tunicate *Trididemnum Solidum*, and Dolastatin 11 was isolated from the sea hare *Dolabella auricularia.* Didemnin B possess a variety of biological activity including high antiviral, antitumor, immunosuppressive activities. It is a potent inhibitor of L1210 and P388 leukemia, B16 melanoma. Didemnin B exhibit antiviral activity against DNA and RNA viruses. Mechanistically, Didemnin B interrupts protein synthesis in target cells by binding non-competitively to palmitoyl protein thioesterase, the immunosuppressive activity of didemnin B is mediated through binding to a site on Nb2 node lymphoma cells. Didemnin B inhibits the ability of eEF-2 to catalyze polypeptide elongation, which demonstrates that it is an inhibitor of ribosomal translocation. Cytotoxicity of Dolastatin 11 is defined by disruption of microfilaments by stimulation of the polymerization of actin [1,2]



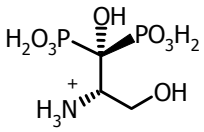
Didemnin B Dolastatin 11

Scheme 1. Didemnin B (left); Dolastatin 11 (right

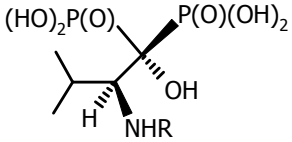
However Didemnin B and, to a certain degree, Dolastatin exhibit high toxicity and poor solubility. For reduction of toxicity of these anticancer drugs we realized their phosphonic modification, because in some cases it is possible to reduce toxicity of anticancer drugs via introduction of phosphonic groups in a molecule of these compounds. With this aim we have synthesized the chiral synthetic blocks **1-6** designed for phosphonate modification of Didemnin and Dolastatin. The compounds **1-6** were prepared starting from natural amino acids. Structure and stereochemical properties of compounds **1-6** were studied by physicochemical methods



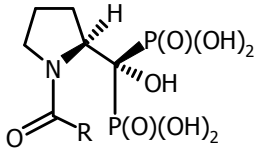
1



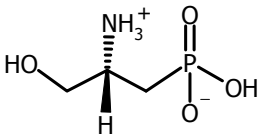
2



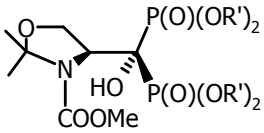
3



4



5



6

References:

1.*A Losada, J.M. Lopez-Oliva, J.M. Sanchez-Puelles, L.F. Garcıa-Fernandez*// Establishment and characterisation of a human carcinoma cell line with acquired resistance to Aplidin - British Journal of Cancer, 2004, Vol. 91, P. 1405-1413.,

2.*D.J. Newman, G.M. Cragg*// Advanced Preclinical and Clinical Trials of Natural Products and Related Compounds from Marine Sources - Current Medicinal Chemistry 2004, Vol. 11, P. 1693-1713.

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ФОТОАКТИВНЫХ ГЕТЕРОДИМЕРОВ НА ОСНОВЕ ТЕТРАФЕНИЛПОРФИРИНА

[1]Коновалова Н.В., [1]Кириенко Е.В., [2]Багдашкин А.Л., [2]Горохов В.В., [2]Пащенко В.З.

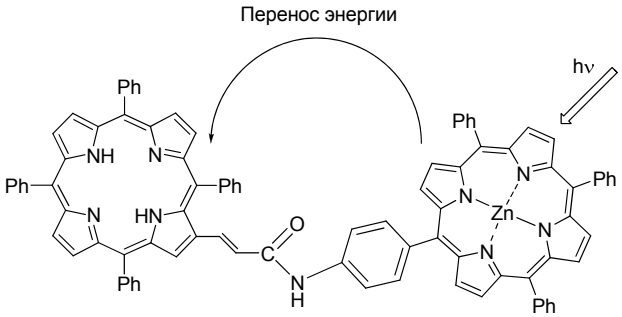
[1]Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия
e-mail: nadejda_73@mail.ru
[2]Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

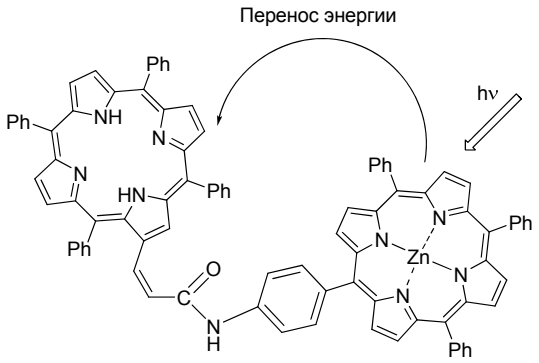
Тетрапиррольные пигменты играют ключевую роль в процессах фотосинтетического преобразования света в химическую энергию [1]. Фотосинтезирующие организмы используют для этой цели фотосистемы, которые содержат светособирающие антенные комплексы, состоящие из большого числа молекул хлорофилла, и связанный с ними фотохимический реакционный центр. При поглощении кванта света пигментом антенны происходит быстрая миграция энергии возбуждения между хромофорами до тех пор, пока она не достигнет "специальной пары" молекул хлорофилла в реакционном центре. Последующий направленный перенос электрона по цепи тетрапиррольных и хиноновых кофакторов, расположенных в реакционном центре, приводит к перемещению электрона к противоположной стороне мембраны, таким образом генерируя трансмембранный потенциал.

В настоящее время тетрапиррольные пигменты широко используются для получения молекулярных энергопреобразующих систем, воспроизводящих основные фотосинтетические процессы: поглощение света, миграцию и перенос энергии возбуждения, перенос электрона. Эффективность этих искусственных систем определяется их дизайном, оптическими и электронными свойствами входящих в их состав пигментов и структурной организацией компонентов.

Один из подходов к функциональному моделированию фотосинтетических систем заключается в замене природных хромофоров (хлорофиллов) на их синтетические аналоги - порфирины и их производные, которые объединяют ковалентными или нековалентными связями в молекулярные системы, и изучении их фотофизических и фотохимических свойств [2].

Нами получены гетеродимеры, состоящие из свободного основания 2-(2-карбоксивинил)-5,10,15,20-тетрафенилпорфирина и цинкового комплекса 5-(*п*-аминофенил)-10,15,20-трифенилпорфирина, ковалентно связанных амидной связью. Введение двойной связи непосредственно в β-положение одного из порфириновых макроциклов приводит к изменению его спектральных характеристик, что позволяет осуществлять селективное возбуждение и наблюдать перенос энергии в этих соединениях. Нами разработан метод получения дипорфириновых соединений **1** и **2**, различающихся конфигурацией двойной связи в составе спейсерной группы. Проведено исследование спектральных и фотофизических свойств полученных гетеродимеров порфиринов, определены квантовые выходы флуоресценции, эффективность и константы скорости переноса энергии.





Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (АВЦП "Развитие научного потенциала высшей школы", проект № 2.1.1/9396).

Литература:

1. *G.R. Fleming, R. van Grondelle.* // The Primary Steps of Photosynthesis - Phys. Today, 1994, v. 47, № 2, p. 48-55
2. *Н.В. Коновалова, Р.П. Евстигнеева, В.Н. Лузгина*. // Синтетические молекулярные системы на основе порфиринов как модели для изучения переноса энергии при фотосинтезе - Успехи химии, 2001, т. 70, № 11, с. 1059-1093

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF PHOTOACTIVE TETRAPHENYLPORPHYRIN-BASED HETERODIMERS

[1]Konovalova N.V., [1]Kirienko E.V., [2]Bagdashkin A.L., [2]Gorohov V.V., [2]Paschenko V.Z.

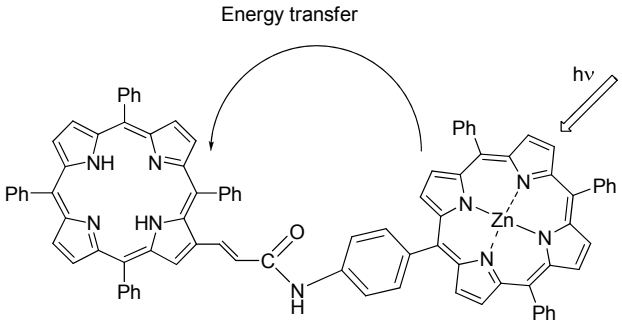
[1]M.V.Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia
e-mail: nadejda_73@mail.ru
[2]M.V.Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

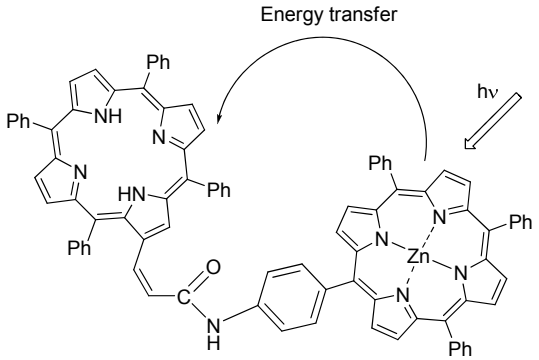
Tetrapyrrolic pigments play a key role in the photosynthetic conversion of light into chemical energy [1]. Photosynthetic organisms employ for this goal photosystems which contain light-harvesting antenna complexes comprised of numerous chlorophyll molecules coupled to a photochemical reaction center. Absorption of a quantum of light by a pigment in the antenna is followed by rapid excitation energy migration among the chromophores until the energy reaches the special pair of chlorophyll molecules in the reaction center. Subsequent vectorial electron transfer along a chain of tetrapyrrolic and quinone cofactors in the reaction center results in the electron moving toward the opposite side of the membrane, thereby generating a transmembrane potential.

At the present time tetrapyrrolic pigments are extensively used for preparing of molecular energy converting systems reproducing the major photosynthetic processes: light absorption, excitation energy migration and transfer, and electron transfer. The efficiency of these artificial systems is determined by their overall design, the optical and electronic properties of the pigments and the structural organization of the components.

One of the approaches to the functional modeling of the photosynthetic systems consists of the replacement of the natural chromophores (chlorophylls) by their synthetic analogs - porphyrins and their derivatives which are linked by covalent or non-covalent bonds into the molecular systems, and the studying of their photophysical and photochemical properties [2].

We have prepared the heterodimers which consist of free base 2-(2-carboxyvinyl)-5,10,15,20-tetraphenylporphyrin covalently linked to zinc 5-(*p*-aminophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin by an amide bond. Introduction of a double bond directly to a β-position of one porphyrin macrocycle results in a modulation of the spectral characteristics, which allows realize selective irradiation and observe an energy transfer in these compounds. The synthetic method resulting in the diporphyrin compounds **1** and **2** with a different configuration of double bond in a spacer group was developed. Investigations of spectral and photophysical properties of prepared porphyrin heterodimers were carried out. The fluorescence quantum yields, efficiency and rate constants of the energy transfer were determined.





This work is supported by the Department of Education and Science of Russian Federation (the Analytical Department Target Program «Development of Scientific Potential of High School», project 2.1.1/ 9396).

References:

1. *G.R. Fleming, R. van Grondelle.* // The Primary Steps of Photosynthesis - Phys. Today, 1994, v. 47, № 2, p. 48-55
2. *N.V. Konovalova, R.P. Evstigneeva, V.N. Luzgina.* // Synthetic molecular systems based on porphyrins as models for the study of energy transfer in photosynthesis - Rus. Chem. Rev., 2001, v. 70, № 11, p. 939-969

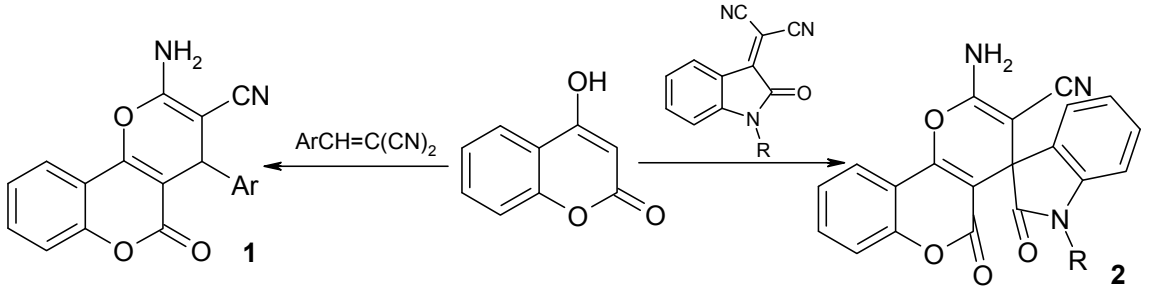
ПРОИЗВОДНЫЕ КУМАРИНА В СИНТЕЗЕ НОВЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Коптева Н.И., Касенкова Т.А., Анисимова Н.Н., Шихалиев Х.С.

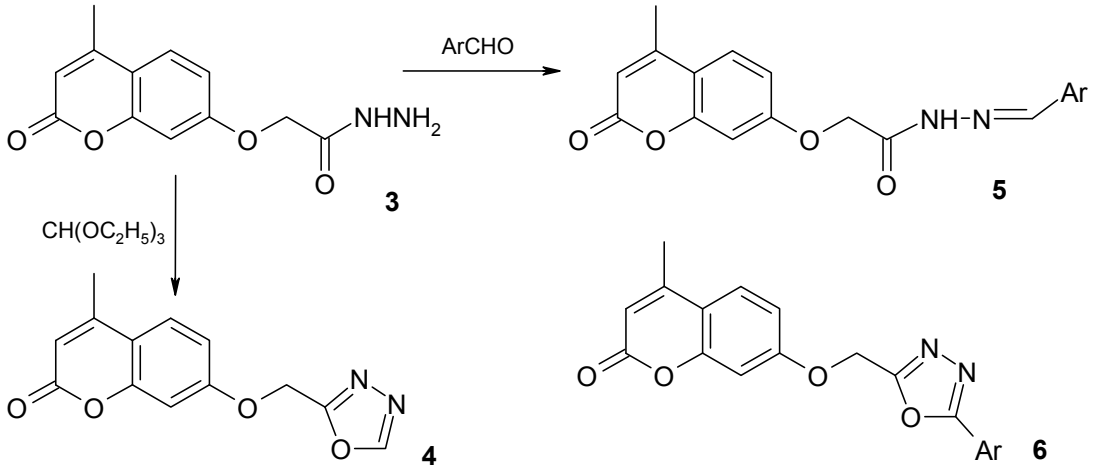
Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия
e-mail: chocd261@chem.vsu.ru

Известна биологическая активность соединений с кумариновым циклом, а также веществ с полигетероатомными циклами [1, 2]. В связи с этим представляет интерес синтез веществ, одновременно содержащих в молекуле эти структурные фрагменты, причем они могут быть конденсированы, спиросочленены или линейносвязаны.

В данной работе проведена конденсация 4-гидроксикумарина с арилиденмалондинитрилами в присутствии основных катализаторов с образованием 2-амино-3-циано-4-арилпирано[3,2-c]кумаринов **1**, а также с *N*-алкил-3-дицианометилен-2-оксиндолами с получением 4-спиро-производных 2-амино-3-циано-пирано[3,2-c]кумаринов **2**:



Взаимодействие гидразида 7-кумариноксиуксусной кислоты **3** с ортомуравьиным эфиром приводит к образованию 2-(7-кумариноксиметил)-1,3,4-оксадиазола **4**:



Арилиденовые производные гидразида 7-кумариноксиуксусной кислоты **5** в реакциях гетероциклизации также дают возможность получать линейносвязанные соединения, содержащие кумариновый и замещенный 1,3,4-оксадиазольный циклы **6**.

Строение вновь синтезированных соединений подтвержденно данными ИК- и ^{1}H ЯМР-спектроскопии.

Виртуальный скрининг новых веществ с помощью программы PASS, разработанной в ИБМХ РАМН (г. Москва http://www.msk.ru./PASS/), показал, что с высокой долей вероятности они могут проявлять антивирусное, противовоспалительное, психотропное, противоопухолевое действие.

Литература:

1.*Кузнецова Г.А.* Природные кумарины и фурокумарины.-Л.: Наука, 1967. - 247 с.
2.*Георгиевский В.П.* Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук.- Новосибирск: Наука, 1990. – 336 с.

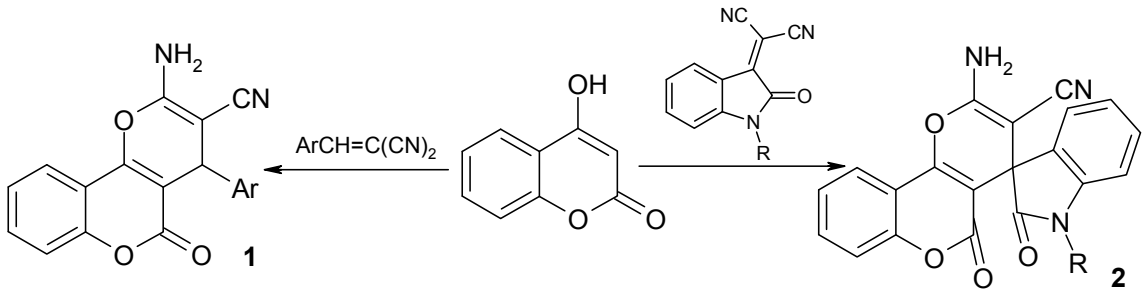
COUMARINE DERIVATIVES IN SYNTHESIS OF NEW HETEROCYCLIC COMPOUNDS

Kopteva N.I., Kasenkova T.A., Anisimova N.N., Shikhaliev Kh.S.

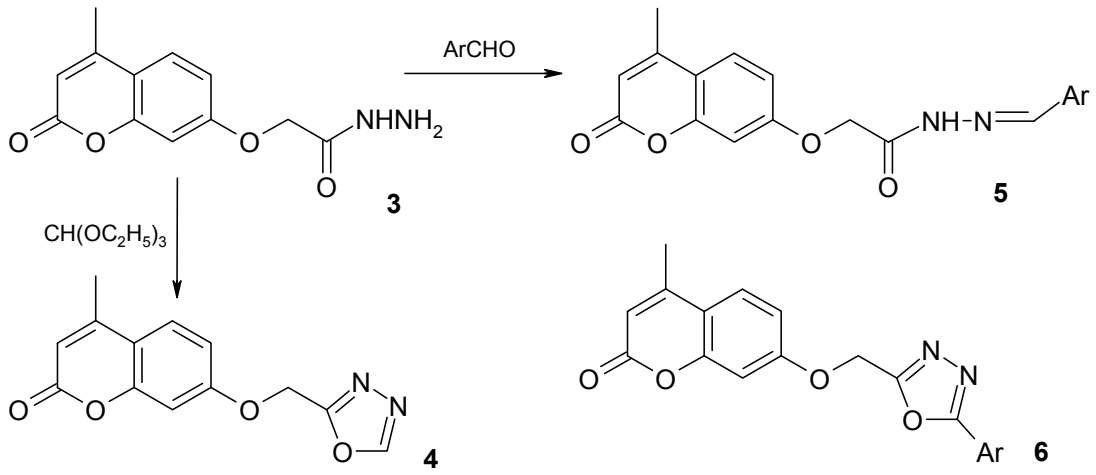
Voronezh state university, Voronezh, Russia
e-mail: chocd261@chem.vsu.ru

Biological activity of compounds with coumarines cycle, and also compounds with polyheteroatoms cycles is known [1, 2]. In this connect synthesis compounds of the simultaneously containing in a molecule these structural fragments is of interest, and they can be condensed, spiro-connecting or linear-connecting.

In the given work condensation 4-hydroxycoumarine with arilidenomalononitriles in the presence of the basic catalysts with formation 2-amino-3-cyano-4-arilpyranocoumarins **1**, and also with N-alkil-3-dicyanometilen-2-oxindoles with formation of 4-spiro-derivatives 2-amino-3-cyano-pyranocoumarins **2** is spent:



Interaction hydrazides 7-coumarinsoxyacetic acids **3** with triethyl orthoformate leads to production 2 (7-coumarinooxymethyl)-1,3,4-oxadiazoles **4**:



Arilidenes derivatives hydrazides 7-coumarinsoxyacetic acids **5** in reactions heterocyclisationes also give the chance to receive linear-connecting compounds containing coumarin and replaced 1,3,4-oxadiazol cycles **6**.

Structure of again synthesized compounds demonstrate the data IR - and 1H NMR-spectroscopy.

Virtual screening of new compounds by means of program PASS developed in IBMKh the Russian Academy of Medical Science (Moscow http:// www.msk.ru./PASS/), has shown that with a high share of probability they can show anti-virus, anti-inflammatory, psychotropic, antineoplastic action.

References:

1.*Kuznetsova G. A.* Pryrodnye kumariny and furokumariny.-L.: Наука, 1967. - 247 s.
2.*Georgievsky V.P.*Biologicheski activnye veschestva lekarstvennyh rastenij / V.P.Georgievsky, N.F.Komissarenko, S.E.Dmitruk. - Novosibirsk: Наука, 1990. – 336 s.

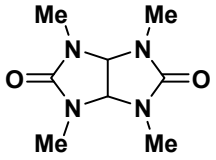
СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ N-(АЦЕТИЛАМИНОЭТИЛ)ГЛИКОЛЬУРИЛОВ

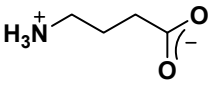
[1]Кравченко А.Н., [1]Газиева Г.А ., [1]Баранов В.В., [2]Аникина Л.В., [2]Вихарев Ю.Б.

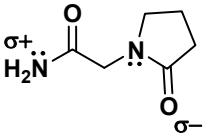
[1]Учреждение Российской академии наук Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского Российской академии наук, Москва, Россия, e-mail: kani@server.ioc.ac.ru
[2]Учреждение Российской академии наук Институт технической химии Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

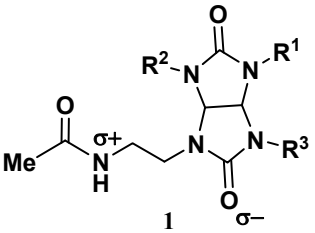
Производные гликольурила (2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-диона) являются новым классом нейротропных соединений. В России внедрён в медицинскую практику дневной транквилизатор мебикар (2,4,6,8-тетраметил-2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3,7-дион).

Известно, что в основе действия ноотропов лежат ГАМК-ергические эффекты. Механизм действия мебикара неизвестен, но высказываются предположения о его действии на ГАМК-ергическую систему. Электронные особенности пирацетама (ноотропила) и ГАМК (γ-аминомасляной кислоты с учетом ее цвиттер-ионной природы) имеют определенное сходство. Аналогичным образом можно модифицировать и молекулу гликольурила.

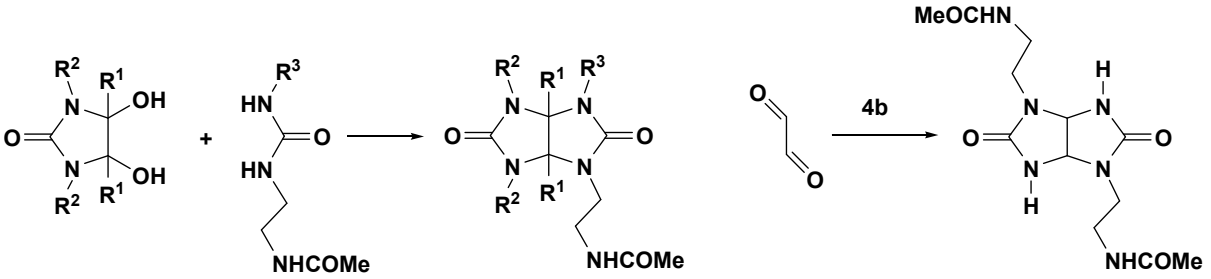

Мебикар


ГАМК


Пирацетам


1

Целевые гликольурилы **1a,b** и **2** получены взаимодействием 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-онов **3a,b** или глиоксаля с N-(ацетиламиноэтил)мочевинами **4a,b** в воде или спирте в присутствии HCl.



3a,b **4a,b** **1a,b** **2**

1,3 R^1=R^2=H (**a**), R^1=Ph, R^2=Me (**b**), **1,4** R^3=Me (**a**), H (**b**)

Исследование нейротропной и цитотоксической активности проводили в Институте технической химии УрО РАН.

Нейротропную активность изучали на беспородных белых мышах-самцах массой 22-24 г в тестах «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», анальгетическую активность определяли «методом «горячей пластинки», ноотропную активность оценивали по влиянию на выработку условного рефлекса пассивного избегания. Цитотоксические свойства исследовались на клетках млекопитающих SPEV (нормальный почечный эпителий), RD (рабдомиосаркома), MS (меланома) и A549 (мелкоклеточный рак легкого) по МТТ-тесту (МТТ – краситель - соль тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид).

Установлено, что соединения **1a,b** оказывают анксиолитическое действие, аналогичное препарату сравнения мебукару в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Соединение **2** обладает небольшой анальгетической активностью (время наступления оборонительного рефлекса через 2 часа после введения соединения **2** увеличилось на 52%). Соединение **1a** проявило выраженное ноотропное действие, превышающее действие мебикара и пирацетама. Все исследованные соединения не проявили токсичности в опытах *in vivo* и *in vitro*, а также заметного цититоксического действия на линиях опухолевых клеток.

Работа выполнена при поддержке госконтракта № 2.740.11.0258.

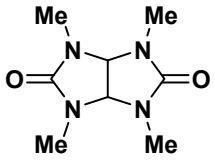
SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF N-(ACETHYLAMINOETHYL)GLYGOLURYLS

[1]Kravchenko A.N., [1]Gazieva G.A ., [1]Baranov V.V., [2]Anikina L.V., [2]Vikharev Yu.B.

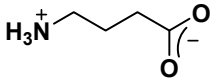
[1]N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
e-mail: kani@server.ioc.ac.ru
[2] Institute of Technical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Ural Branch, Perm, Russia

Derivatives of glycoluryls (2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.0]octane-3,7-dione) are a new class of neurotropic compounds. Mebikar (2,4,6,8-tetramethyl-2,4,6,8- tetraazabicyclo[3.3.0]octane-3,7-dione), a day-time tranquilizer, has been implemented in medical practice in Russia.

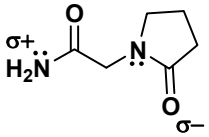
Nootropics action is known to be based on GABA-ergic effects. The Mebikar's action mechanism has been unclear though there are assumptions that it impacts the GABA-ergic system. Pyracetam (Nootropil) and GABA (γ-aminobuteric acid in terms of its zwitter-ionic nature) are to a certain extent similar as regards their electronic features. By analogy, it is possible to modify the glycoluryl molecule.



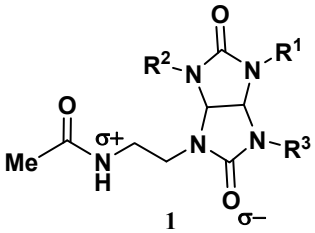
Мебикар



ГАМК

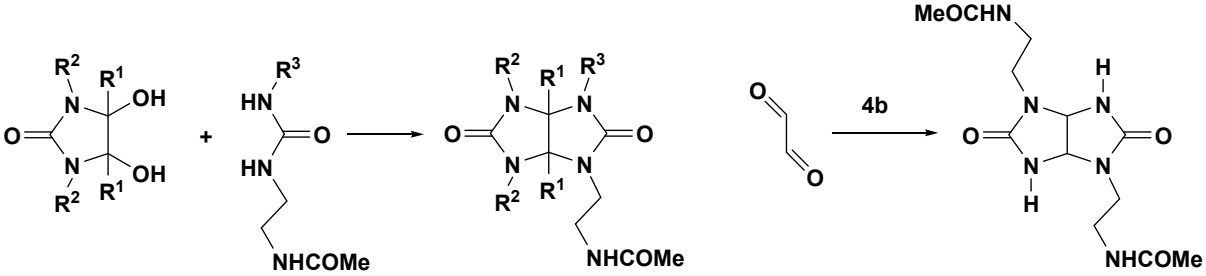


Пирацетам



1

Target glycoluryl **1a,b** and **2** were prepared by the interaction of 4,5-dihydroxyimidazolidin-2-ones **3a,b** or glyoxal with N-(acetylaminoethyl)ureas **4a,b** in water or alcohol in the presence of HCl.



3a,b **4a,b** **1a,b** **2**

1,3 R^1=R^2=H (**a**), R^1=Ph, R^2=Me (**b**), **1,4** R^3=Me (**a**), H (**b**)

A research on neurotropic and cytotoxic activity was performed in Institute of Technical Chemistry of RAS Ural Department.

Neurotropic activity was examined on white outbread male mice, mass 22-24 g, in open field and elevated plus maze tests, analgetic activity was tested by the hot plate method, and nootropic activity was evaluated by the influence on passive escape reflex conditioning. The cytotoxic properties were examined on SPEV (normal renal epithelium), RD TE32 (rhabdomyosarcoma), MS (melanoma) and A549 (lung carcinoma) cells of mammalia in MTT-test (MTT – (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).

It has been established that compounds **1a,b** produce an anxiolytic effect similar to the benchmark Mebikar in the elevated plus maze test. Compound **2** has mild analgetic activity (defense reflex onset time increased by 52% in two hours after the compound **2** injection). Compound **1a** exhibited a pronounced nootropic action exceeding that of Mebikar and Pyracetam. All tested compounds displayed no toxicity in *in vivo* and *in vitro* tests as well as no noticeable cytotoxic action on tumor cell lines.

The research was supported by the State contract № 2.740.11.0258.

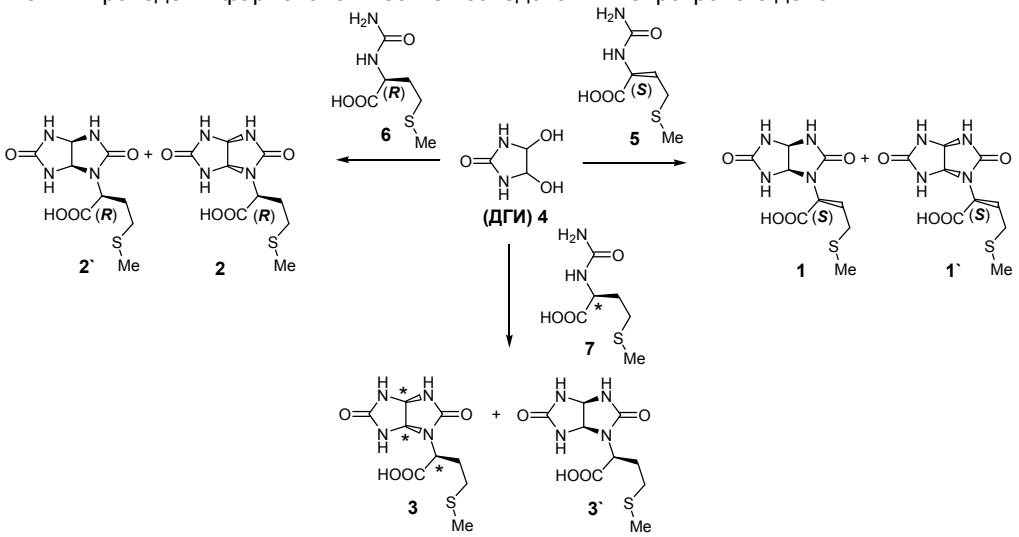
СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЭНАНТИОМЕРОВ И РАЦЕМАТОВ 2-(3,7-ДИОКСО-2,4,6,8-ТЕТРААЗАБИЦИКЛО[3.3.0]ОКТ-2-ИЛ)-4-МЕТИЛТИОБУТАНОВОЙ КИСЛОТЫ

[1]Кравченко А.Н., [1]Баранов В.В., [2]Аникина Л.В., [2]Вихарев Ю.Б.

[1]Учреждение Российской академии наук Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского Российской академии наук, Москва, Россия, e-mail: kani@server.ioc.ac.ru
[2]Учреждение Российской академии наук Институт технической химии Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

Классическими примерами, подтверждающими факт различного действия энантиомеров, обладающих фармацевтической активностью, являются кетамин, пеницилламин и талидомид. Создание энантиомерно чистых лекарственных средств является одной из важнейших фундаментальных задач современного этапа развития медицинской химии. Известно, что гликольурилы являются классом веществ, проявляющих нейротропные свойства [1-3], поэтому синтез и исследование активности энантиомерно чистых гликольурилов сравнении с рацематами очень актуально.

Для сравнительного изучения фармакологического действия гликольурилов нами разработан диастереоселективный синтез энантиомерно чистых гликольурилов **1**,**1`**,**2** и **2`** и диастереоспецифичный синтез рацемата **3** на основе конденсаций 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-она **4** с (S), (R) и (R,S)-N-карбамоилметионинами **5**-**7** в условиях кислотного катализа при кипячении реагентов в воде. Индивидуальные диастереомеры **1**,**1`**,**2** и **2`** получены дробной кристаллизацией из воды. Рацемат **3** содержал примесь второго рацемата **3`** (соотношение **3** : **3`** составляет 6:1). Для всех полученных продуктов были проведены фармакологические исследования нейротроного действия.



Сравнительная оценка нейротропной активности энантиомеров была проведена *in vivo* на белых беспородных мышах в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» до и после гипоксии. Было установлено, что рацемат (**3**+**3`**) не влияет на поведение мышей до гипоксического воздействия, однако стимулирует двигательную и исследовательскую активность мышей после гипоксии в тесте «открытое поле». Очевидно, это происходит исключительно за счет стереоизомера **1**(входит в состав 3), который, не влияя на интактных мышей, после гипоксии повышает двигательную активность в приподнятом крестообразном лабиринте и исследовательскую активность в обоих тестах. Стереоизомер **1`** не изменяет поведение животных до и после гипоксического воздействия. Стереоизомер **2**, снижая двигательную активность интактных мышей в «приподнятом крестообразном лабиринте», после гипоксии действует угнетающе на двигательную и исследовательскую активность в «открытом поле». Стереоизомер **2`**, не влияя на интактных мышей, демонстрирует несколько угнетающее действие на центральную нервную систему, снижая двигательную активность мышей после гипоксии в обоих тестах. Таким образом, из четырех полученных энантиомеров только один **1** способен компенсировать отклонения в поведении животных, вызванные гипоксией.

Литература:

1.*Машковский М.Д.* Лекарственные средства. М.: Новая волна, 2005, 1, 86.
2.*Ю.Б. Вихарев., Л.В. Аникина, И.Е. Чикунов, А.С. Сигачев, А.Н. Кравченко, Ю.В. Шкляев, Н.Н. Махова* // Нейропротекторные свойства N-функциональнозамещенных гликольурилов - Вопросы биол. мед. и фарм. химии. 2006, (2), 12.
3.*A. N. Kravchenko, L.V. Anikina, Yu.B. Vikharev, V. V. Baranov, G.A. Gazieva, S.V.Vasilevskii, N.N. Mahkova* // Synthesis and Biological Activity of Bi-, Bis- and Polyheterocyclic Compounds Based on Ureas and their Analogs - Abstracts of Scientific Conference “Biologically active Substences: Fundamental and Applied Problems”, Ukraine, AR Crimea, Novy Svet, may 25-30 2009, 101.

SYNTHESIS AND RESEARCHES OF FARMACOLOGY ACTIVITY ENANTIOMERS AND RACEMIC OF 2-(3,7-DIOXO-2,4,6,8-TETRAAZABICYCLO[3.3.0]OKT-2-IL)-4-METHYLTHIOBUTANIC ASID

[1]Kravchenko A.N., [1]Baranov V.V., [2]Anikina L.V., [2]Vikharev Yu.B.

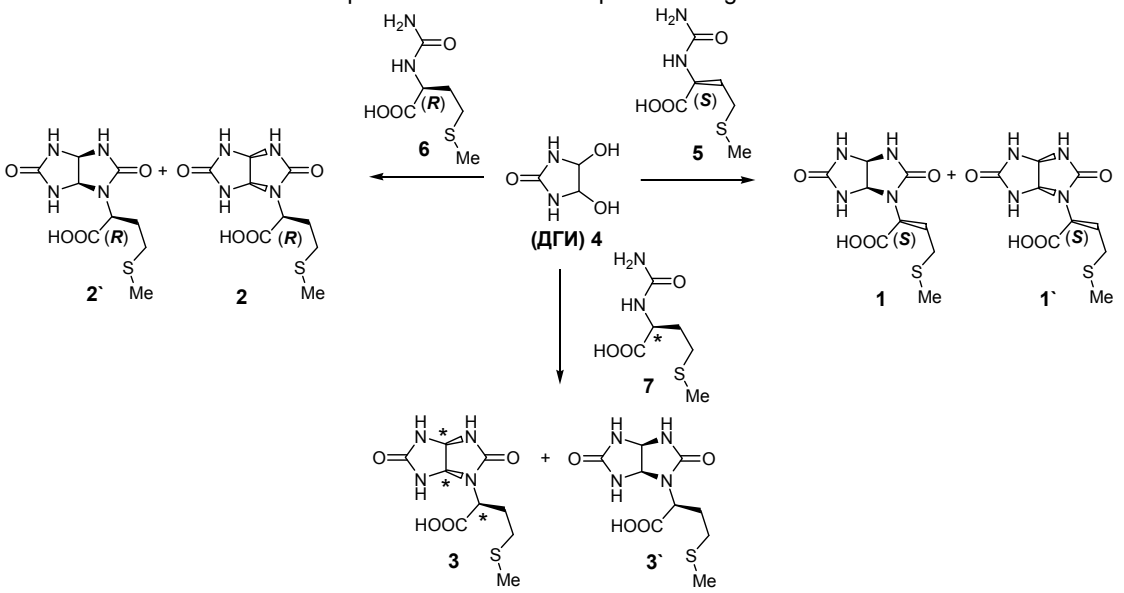
[1]N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
e-mail: kani@server.ioc.ac.ru
[2] Institute of Technical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Ural Branch, Perm, Russian Federation

Ketamine, penicillamine and thalidomide are classic examples in support of the fact that pharmacologically active enantiomers exert different action.

The development of enantiomer-pure medications are among the most crucial basic research objectives at the current stage of medicinal chemistry.

Glycoluryls are known as a class of compounds that exhibit neurotropic properties [1-3], why is why researches on the synthesis and activity of enantiomer-pure glycoluryls in comparison with racemates are highly relevant.

For a comparative study of glycoluryl pharmacological activity we designed a distereoselective synthesis of enantiomer-pure glycoluryls **1,1`,2** and **2`** and a distereospecific synthesis of racemate **3** based on condensations of 4,5-dihydroxyimidazolidin-2-one 4 with (S), (R) and (R,S)-N-carbamoylmethionines 5-7 in the acidic catalysis conditions and with reagents boiling in water. Diastereomers **1,1`,2** and **2** were prepared by fractional crystallization from water. Racemate **3** contained admixture of second racemate **3'** (a ratio of **3** : **3`** was 6 : 1). All end products were tested for neurotropic action in a series of pharmacological tests.



The comparative assessment of enantiomer neurotropic activity was carried out *in vivo* in white outbread mice in open field and elevated plus maze tests before and after hypoxia. No impact of racemate (**3+3`**) on mice's behavior was marked prior to hypoxic exposure, whereas it stimulated mice's post-hypoxia motor and exploratory performance in the open field test. This happens evidently due to stereoisomer **1** (**1** is the component of **3**), which, producing no effect on intact mice, enhances post-hypoxia motor performance in the elevated plus maze test and exploratory activity in both tests. Stereoisomer **1`** does not change mice's behavior both before and after hypoxia. Stereoisomer **2** reduces motor activity of intact mice in the elevated plus maze test and inhibits post-hypoxia motor and exploratory behavior in the open field test. Stereoisomer **2`**, not affecting intact mice, displays certain inhibitory action on the central nervous system manifested in poorer motor activity after hypoxia in both tests. Hence, from the four enantiomers, only one **1** is able to compensate for hypoxia-caused behavior deviations in animals.

References:

1.*M.D. Mashkovsky.* Lekarstvenyie sredstva // Novaya volna. 2007, **1**, p.83 (in Russian) .
1.*Yu. B. Vikharev, L. V. Anikina, I. E. Chikunov, A. S. Sigachev, A. N. Kravchenko, Yu. V. Shklyaev, N. N. Makhova,*Vopr. Biol. Med. Farm. Khim. [Problems in Biological, Medicinal and Pharmaceutical Chemistry], 2006, No. 2, p.12 (in Russian).
2.*A. N. Kravchenko, L.V. Anikina, Yu.B. Vikharev, V. V. Baranov, G.A. Gazieva, S.V.Vasilevskii, N.N. Mahkova* // Synthesis and Biological Activity of Bi-, Bis- and Polyheterocyclic Compounds Based on Ureas and their Analogs - Abstracts of Scientific Conference "Biologically active Substences: Fundamental and Applied Problems", Ukraine, AR Crimea, Novy Svet, may 25-30 2009, 101.

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТИОГЛИКОЛЬУРИЛОВ

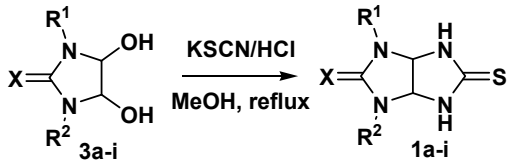
[1]Кравченко А.Н., [1]Газиева Г.А., [1]Баранов В.В., [2]Аникина Л.В., [2]Вихарев Ю.Б., [3]Крылова И.О., [3]Злыгостева М.В., [1]Махова Н.Н.

[1]Учреждение Российской академии наук Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского Российской академии наук, Москва, Россия, e-mail: kani@server.ioc.ac.ru
[2]Учреждение Российской академии наук Институт технической химии Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия
[3]Естественнонаучный институт Пермского государственного университета, Пермь, Россия

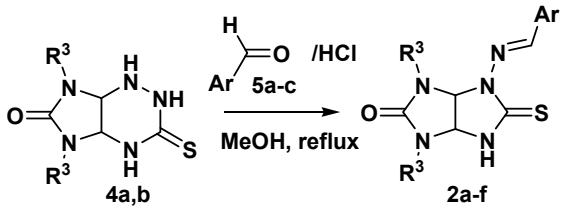
Создание новых подходов к получению практически важных органических соединений, в том числе потенциально биологически активных, является одной из важнейших фундаментальных задач современного этапа развития медицинской химии. Коллектив лаборатории азотсодержащих соединений ИОХ РАН решает эту задачу на примере тиогликольурилов - тиоаналогов бициклических бисмочевин октанового ряда.

Известно, что тиогликольурилы получают взаимодействием 4,5-дигидроксиимидазолидин-2-онов(тионов) (ДГИ, ДГИТ) и тиомочевин или мочевин соответственно, но эти реакции изучены на единичных примерах [1].

С целью разработки новых способов синтеза тиогликольурилов **1a-i** и тиогликольурилов нового поколения **2a-f** в настоящей работе нами исследованы 2 подхода: конденсация ДГИ и ДГИТ **3a-i** с роданистоводородной кислотой, полученной *in situ* из KSCN и соляной кислоты; и реакция сужения имидазотриазинов **4a,b** под действием ароматических альдегидов, что позволило получить целевые соединения **1a-i** и **2a-f** . Наилучшие выходы тио- и дитиогликольурилов **1a-i** (67-89%) достигаются при использовании двухкратного количества KSCN и соляной кислоты. На выходы N-арилиденамино-тиогликольурилов **2a-f** (28-69%) оказывают влияние структурные факторы в арилальдегидах **5a-c**.



1,3 X=O, R^1=R^2=H (a), Me (b), Et (c), R^1=Me, R^2=t-Bu (d), R^1=H, R^2=c-Hex (e), X=S, R^1=R^2=H (f), Me (g), Et (h), Ph (i).



2 Ar=Ph, R^3=Me (a), Et (b), Ar=C6H4Br-4, R^3=Me (c), Et (d), Ar=C6H4OMe-4, R^3=Me (e), Et (f).
4 R^3=Me (a), Et (b).
5 Ar=Ph (a), C6H4Br-4 (b), C6H4OMe-4 (c).

Выявление противомикробной и цитотоксической активности проводили в Научно-исследовательской лаборатории «Бактерицид» Естественнонаучного института Пермского государственного университета и в Институте технической химии УрО РАН соответственно.

Противомикробная активность изучалась в на 2-х музейных штаммах микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* (штамм 906) – грамположительный факультативный анаэроб и *Escherichia coli* (штамм 1257) – грамотрицательный факультативный анаэроб, относящийся к 4-ой группе по классификации микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний человека (приложение № 1 к СП 1.3.2322-08). Все вещества растворяли в диметилсульфоксиде. Анализ полученных данных показал, что соединение **1i** обладает только ингибирующим действием в отношении *St. aureus*.: минимальная ингибирующая концентрация (МИК) для соединения **1i** – 3,9 мгк/мл. Соединение **1b** обладает как ингибирующим действием, так и бактерицидным в отношении *St. aureus*. МИК соединения **1b** – 31,2 мкг/мл, а минимальная бактерицидная концентрация (МБК) составила – 125,0 мкг/мл.

Цитотоксические свойства исследовались на клетках млекопитающих SPEV (нормальный почечный эпителий), RD (рабдомиосаркома), MS (меланома) и A549 (мелкоклеточный рак легкого) по МТТ-тесту (МТТ – краситель - соль тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид). Установлено, что наиболее перспективно соединение **2f**, проявляющее цитотоксическое действие на клетках RD (IC_{50}=6,05±1,89 мМ/л) и MS (IC_{50}=20±4,03 мМ/л).

Работа выполнена при поддержке программы ОХНМ РАН (ОХ-9).

Литература:

1. *В.А. Ересько, Л.В. Епишина, О.В. Лебедев, М.В. Повстяной, Л.И. Хмельницкий, С.С. Новиков* // Исследование в области химии бициклических мочевин. Сообщение 3. Синтез 2,4,6,8-тетраазабицикло[3.3.0]октан-3-тионов-7 - Изв. АН СССР. Сер. хим., 1980, №7, с. 1594-1596.

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THIOGLYCOLURILS

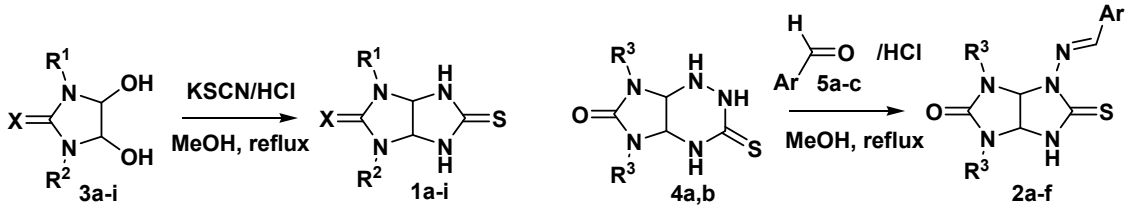
[1]Kravchenko A.N., [1]Gazieva G.A ., [1]Baranov V.V., [2]Anikina L.V., [2]Vikharev Yu.B., [3]Krylova I.O., [3]Zlygosteva M.V., [1]Makhova N.N.

[1]N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
e-mail: kani@server.ioc.ac.ru
[2] Institute of Technical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Ural Branch, Perm, Russian Federation
[3] Natural Science Institute of Perm State University, Perm, Russian Federation

Designing new approaches to the synthesis of new practicable organic compounds, including those with potential biological activity, stands among the most critical basic research goals of state-of-the-art medicinal chemistry .The research team of ZIOC RAS Laboratory of Nitrogen-Containing Compounds addresses this issue by examining thioglycoluryls – thio analogs of bicyclic bisureas of the octane sequence.

Thioglycoluryls are known to be prepared by an interaction of 4,5-dihydroxyimidazolidin-2-ones(thiones) (DHI, DHIT) and thioureas or ureas, accordingly, though only a few examples of these reactions have been studied so far [1].

With a view to develop new procedures for synthesizing thioglycoluryls **1a-l** and a new generation of **2a-f** within this research we looked at two possible routes such as condensation of DHI and DHIT **3a-i** with thiocyanic acid prepared *in situ* from KSCN and hydrochloric acid, and a ring contraction reaction of imidazotriazines **4a,b** under the impact of aromatic aldehydes, which led to targeted **1a-i** and **2a-f**. The best yields of thio- and dithioglycoluryls **1a-i** (67-89%) are achieved where a double amount of KSCN and hydrochloric acid is used. Structural factors in arylaldehydes **5a-c** affect yields of N-arylidenamino-thioglycoluryls **2a-f** (28-69%).



1,3 X=O, R^1=R^2=H (a), Me (b), Et (c), R^1=Me, R^2=t-Bu (d), R^1=H, R^2=c-Hex (e), X=S, R^1=R^2=H (f), Me (g), Et (h), Ph (i).

2 Ar=Ph, R^3=Me (a), Et (b), Ar=C6H4Br-4, R^3=Me (c), Et (d), Ar=C6H4OMe-4, R^3=Me (e), Et (f).
4 R^3=Me (a), Et (b).
5 Ar=Ph (a), C6H4Br-4 (b), C6H4OMe-4 (c).

The antimicrobial and cytotoxic activity detection was performed, accordingly, in Scientific Research Laboratory *Bactericide* of Natural Science Institute affiliated with Perm State University and Institute of Technical Chemistry of RAS Ural Branch.

Antimicrobial activity was investigated in two museum strains of microorganisms: *Staphylococcus aureus* (strain 906) – a gram-positive facultative anaerobe and *Escherichia coli* (strain 1257) – a gram-negative facultative anaerobe assigned to Group 4 by the classification of microorganisms-causative agents of human infections (Annex 1 to SP 1.3.2322-08). Each substance was dissolved in dimethylsulfoxide. As shown by the analysis, **1i** exerts only inhibitory action on *St. aureus*.: minimum inhibitory concentration (MIC) for **1i** is 3.9 μg/ml whereas **1b** has both inhibitory and bactericidal action toward *St. aureus*. **1b** MIC is 31,2 μg/ml and minimum bactericidal concentration (MBC) – 125.0 μg/ml.

The cytotoxic properties were examined on SPEV (normal renal epithelium), RD TE32 (rhabdomyosarcoma), MS (melanoma) and A549 (lung carcinoma) cells of mammalia in MTT-test (MTT – (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Compound **2f** appeared more promising since it exerts cytotoxic action on RD (IC_{50}=6,05±1,89 mM/l) и MS (IC_{50}=20±4,03 mM/l) cells.

The research was supported by the RAS Ch&MSD Program (ChD-9).

References:

1.*V. A. Eres'ko, L. V. Epishina,O. V. Lebedev, M. V. Povstyanoi, L. I. Khmel'nitskii, S. S. Novikov* // Chemistry of bicyclyc ureas. 5. Synthesis of 2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.0]-3-octane-7-thiones - Bull. Akad. Sci. USSR. Div.Chem.Sci. (Engl.Transl.), 1980, **29**, No 7, p. 1138-1140.

СИНТЕЗ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТИЕНО[2,3-d]ПИРИМИДИНОВ

Кривовяз А.А., Сливка М.В., Лендел В.Г.

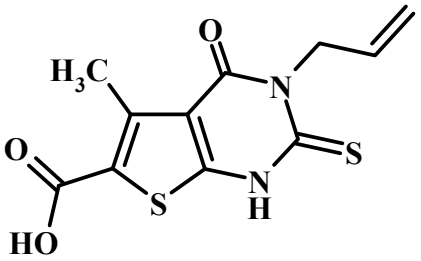
Ужгородский национальный университет, Ужгород, Украина.
e-mail: 1977andr13@mail.ru, mikhailslivka@gmail.com

Общеизвестно, что производные пиримидина очень распространены в природе. В комбинации с тиофеновым гетероциклом такие соединения проявляют больший антимикробный эффект [1] по отношению к сапрофитным микроорганизмам, чем современные антибиотики III-IV поколения. Кроме того, было доказано, что присутствие селена в гетероциклической системе тиено[2,3-d]пиримидина увеличивает антимикробное действие. Результаты такого исследования были представлены в работе [2].

Для создания большего ассортимента органических соединений содержащих селен в своем составе и владеющих биологической активностью, нами был произведен синтез нового гетероциклического соединения **(1)**. Интерес к этому продукту вызван одновременным присутствием в его строении аллильного фрагмента и фармакоформных меркапто- и карбоксильной групп. Такие активные центры делают также возможными проведение реакций циклизации действием электрофильных реагентов (Br_2, I_2, $SeBr_4$, $PhSeBr_3$).

Соединение **(1)** было получено реакцией Гевальда из ацетоуксусного эфира, элементарной серы и циануксусного эфира в присутствии диэтиламина. Выделенное тиофеновое производное в реакции с аллилизотиоцианатом образует замещенную тиомочевину, которая под действием спиртового раствора гидроксида калия образует конечную систему тиено[2,3-d]пиримидина.

Строение полученного продукта **(1)** подтверждено данными ЯМР ^{1}H спектром, а состав элементным анализом.



1

Литература:

1. *Литвинов В.П.* Тиенопиримидины: получение свойства и биологическая активность. / Известия РАН. Серия: Химия. – 2004. – 1976. - № 10. – С. 463-490.
2. Патент (Україна), заявка № 53671 U, МПК C07 D 498|00, C07 D 513|00, C07 D 517|00, C12 Q 1|18. Солі тієно [3',2':5,6] піримідино[2,1-b][1,4,3]тіаселеназин-12-ію, що мають антимікробну активність. /Кривов'яз А.О., Коваль Г.М., Сливка М.В., Лендєл В.Г. / Заявл.03.04.2010. Опубліковано 11.10.2010. Бюл. № 19, 8с.

SYNTHESIS OF NEW THIENO[2,3-d] PYRIMIDINE

Kryvov'yaz A.A., Slivka M.V., Lendel V.G.

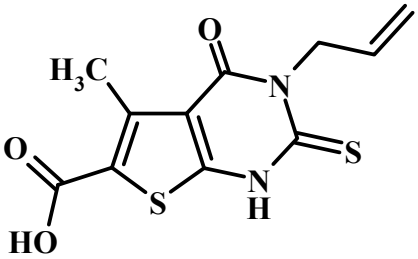
National University of Uzhgorod, Uzhgorod, Ukraine
e-mail: mvslivka@email.ua, 1977andr13@mail.ru

It is well known that pyrimidine derivatives is very widespread in nature. In combination with the thiophene heterocycle such compounds show a greater antimicrobial effect [1] in relation to saprophytic microorganisms than modern antibiotics III-IV generation. In addition, it was shown that the presence of selenium in the heterocyclic system thieno [2,3-d] pyrimidine increases antimicrobial action. The results of this study were presented in [2].

To create a greater range of organic compounds containing selenium in its structure and possessing biological activity, we have produced a new synthesis of heterocyclic compounds **(1).** Interest in this product has caused a simultaneous presence in its structure allyl fragment and farmakoformnyh mercapto- and carboxyl groups. Such active sites do also conducting cyclization reactions action of electrophilic reagents (Br_2, I_2, $SeBr_4$, $PhSeBr_3$).

Compound **(1)** was obtained by reaction Gevalda of acetoacetic ester, elemental sulfur and tsianuksusnogo ester in the presence of diethylamine. Dedicated thiophene derivative in reaction with allylizothiotsianatom substituted thiourea, which is under the influence of an alcoholic solution of potassium hydroxide forms a finite system of thieno [2,3-d] pyrimidine.

The structure of the product **(1)** was confirmed by ^{1}H NMR spectrum and composition of elemental analysis.



1

References:

1. *Литвинов В.П.* Тиенопиримидины: получение свойства и биологическая активность. / Известия РАН. Серия: Химия. – 2004. – 1976. - № 10. – С. 463-490.
2. Патент (Україна), заявка № 53671 U, МПК C07 D 498|00, C07 D 513|00, C07 D 517|00, C12 Q 1|18. Солі тієно [3',2':5,6] піримідино[2,1-b][1,4,3]тіаселеназин-12-ію, що мають антимікробну активність. /Кривов'яз А.О., Коваль Г.М., Сливка М.В., Лендєл В.Г. / Заявл.03.04.2010. Опубліковано 11.10.2010. Бюл. № 19, 8с.

ПОИСК НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ЦИТОКИНИНОВОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ N^6-ПРОИЗВОДНЫХ АДЕНОЗИНА

[1] Кривошеев Д.М., [2] Колячкина С.В., [2] Алексеев К.С., [1]Ломин С.Н., [1]Гетман И.А., [2] Тараров В.И., [2] Михайлов С.Н., [1]Романов Г.А.

[1]Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва, Россия
e-mail gar@ippras.ru
[2]Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Цитокинины представляют собой группу растительных гормонов и близких по активности синтетических биорегуляторов, которые оказывают многообразное действие на рост и развитие растений [1]. Природные цитокинины имеют относительно простое строение. Это N^6-производные аденина, содержащие короткие алифатические цепи типа остатка изопентенила. Различают цитокинины изопентенильного типа (iP-типа) и цитокинины зеатинового типа (Z-типа). Кроме того, встречаются и другие формы цитокининов, например, дигидрозеатин (с насыщенной изопреноидной боковой цепью), а также ароматические цитокинины, такие, как 6-бензиламинопурин и его (мета)гидроксилированное производное (тополин). Цитокинины – производные аденина – в природе часто представлены в виде рибозидов, глюкозидов и др.

Цитокинины и их аналоги имеют разнообразное практическое применение в биотехнологиях, агропроизводстве, а в последние годы – и в медицинской практике [1]. В этой связи представляет интерес поиск и/или создание новых соединений с цитокининовой активностью, а также антицитокининов, блокирующих действие этих гормонов. Такие соединения могут быть использованы как в фундаментальных исследованиях, так и в практических целях.

Нами был проведен химический синтез ряда новых N^6-производных аденозина [2]. Биологическая активность синтезированных соединений была исследована с применением специфических биотестов. Один из биотестов базировался на анализе активности репортерного гена *GUS* под контролем цитокинин-чувствительного промотора (гена *ARR5*) у проростков трансгенного арабидопсиса [3]. Другим биотестом служил анализ содержания пигмента амарантина у проростков амаранта [4].

В результате работы мы дифференцировали синтезированные соединения на активные и неактивные. В частности, среди активных соединений оказались: N^6-(4-окси-2-бутинил)аденозин, N^6-(бензилоксиметил)аденозин и O^6-бензилинозин, а среди неактиных - N^6-(2-пропинил)аденозин, N^1-бензиладенозин и N^6-[(1-метил-1,2,3-триазол-4-ил)метил]аденозин. Эти же соединения были испытаны на способность вытеснять меченый *транс*-зеатин из комплекса с цитокининовыми рецепторами арабидопсиса и кукурузы, на основе тест-системы трансгенных бактерий, экспрессирующих рецепторы цитокининов [5]. В целом наблюдалась хорошая корреляция между способностью соединения конкурировать с меченым зеатином за гормон-связывающий сайт рецептора и гормональной активностью этого соединения в цитокининовых биотестах. Эти результаты показывают, что новые активные соединения обладают истинной цитокининовой активностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (проекты №11-04-00614 и 11-04-01958) и программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология»

Литература:

1. *Г.А. Романов* // Как цитокинины действуют на клетку – Физиол. растений, 2009, т. 56, №2, с. 295-319
2. *S.V. Kolyachkina, V.I. Tararov, C.S. Alexeev, S.N. Mikhailov*. Synthesis of N^6-substituted adenosines. Collection Symposium series, 2011, in press.
3. *G.A. Romanov, J.J. Kieber, T. Schmulling* // Rapid cytokinin response assay in *Arabidopsis* indicates a role for phopholipase D in cytokinin signalling – FEBS Letters, 2002, v. 515, p. 39-43
4. *G.A. Romanov, I.A. Getman, T. Schmulling* // Investigation of early cytokinin effects in a rapid *Amaranthus* seedling test – Plant Growth Regul., 2000, v. 32, p. 337-344
5. *G.A. Romanov, S.N. Lomin* // Hormone-binding assay using living bacteria expressing eukaryotic receptors – Meth. Mol. Biol. (Humana Press), 2009, v. 495, p.111-120

SEARCH FOR NEW COMPOUNDS WITH CYTOKININ ACTIVITY AMONG SYNTHETIC N^6-DERIVATIVES OF ADENOSINE

[1] Krivosheev D.M., [2]Kolyachkina S.V., [2]Alexeev C.S., [1]Lomin S.N., [1]Getman I.A., [2]Tararov V.I., [2] Mikhailov S.N., [1] Romanov G.A.

[1] Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia
e-mail gar@ippras.ru
[2] Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow, Russia

Cytokinins are a group of plant hormones and similar in activity of synthetic bioregulators, which have diverse effects on plant growth and development [1]. Natural cytokinins have a relatively simple structure. They are N^6-adenine derivatives containing short aliphatic chains such as isopentenyl residue. Isopentenyl-type (iP-type) and zeatin-type (Z-type) cytokinins are distinguished. In addition, there are other forms of cytokinins, for example, dihydrozeatin (with a saturated isoprenoid side chain) and aromatic cytokinins, such as 6-benzylaminopurine and its (meta) hydroxylated derivative (topolin). Cytokinins - adenine derivatives – are often presented in planta as ribosides, glucosides, etc.

Cytokinins and their analogs have a variety of practical applications in biotechnology, agro-production, and in recent years - also in medical practice [1]. In this connection, the search and/or creation of new compounds with cytokinin or anticytokinin activity is of common interest. Such compounds can be used both in basic research and for practical purposes.

We carried out the chemical synthesis of new derivatives of N^6-adenosine [2]. Biological activity of synthesized compounds was investigated using specific bioassays. One of the bioassays was based on an analysis of the activity of the reporter gene *GUS* under the control of cytokinin-responsive promoter (gene *ARR5*) in seedlings of transgenic *Arabidopsis* [3]. As other bioassay served the analysis of pigment amaranthin content in *Amaranthus* seedlings [4].

As a result of the work we have differentiated synthesized compounds to active and inactive. In particular, among the active compounds were: N^6-(4-hydroxy-2-butynyl) adenosine, N^6-(benzoxymetyl) adenosine and O^6-benzylinosine, and among inactive - N^6-(2-propynyl) adenosine, N^1-benzyladenosine and N^6-[(1-methyl-1,2,3-triazole-4-yl)methyl] adenosine. These compounds were tested for the ability to displace labeled *trans*-zeatin from the complex with cytokinin receptors of *Arabidopsis* and maize, based on assay system of transgenic bacteria expressing cytokinin receptors [5]. In general there was a good correlation between the ability of compounds to compete with labeled zeatin for hormone receptor-binding site and the hormonal activity of this compound in cytokinin biotests. These results show that the new active compounds possess a true cytokinin activity.

This work was accomplished with the financial support by RFBR grants (projects N11-04-00614 and 11-04-01958) and Program of Presidium RAS «Molecular and Cell Biology»

References:

1. *G.A. Romanov* // How cytokinins affect the cell – Russian J. Plant Physiol., 2009, v. 56, N2, p.
2. *S.V. Kolyachkina, V.I. Tararov, C.S. Alexeev, S.N. Mikhailov*. Synthesis of N^6-substituted adenosines. Collection Symposium series, 2011, in press.
3. *G.A. Romanov, J.J. Kieber, T. Schmulling* // Rapid cytokinin response assay in *Arabidopsis* indicates a role for phopholipase D in cytokinin signalling – FEBS Letters, 2002, v. 515, p. 39-43
4. *G.A. Romanov, I.A. Getman, T. Schmulling* // Investigation of early cytokinin effects in a rapid *Amaranthus* seedling test – Plant Growth Regul., 2000, v. 32, p. 337-344
5. *G.A. Romanov, S.N. Lomin* // Hormone-binding assay using living bacteria expressing eukaryotic receptors – Meth. Mol. Biol. (Humana Press), 2009, v. 495, p.111-120

ПРОДУКТИ РЕАКЦІЇ ПОХІДНИХ АМІНОІЗОІНДОЛУ З МАЛЕЇНІМІДАМИ ЯК ПОТЕНЦІЙНІ МАРКЕРИ БІОЛОГІЧНИХ МОЛЕКУЛ

Крикун С.О., Єгорова Т.В., Левков І.В., Войтенко З.В.

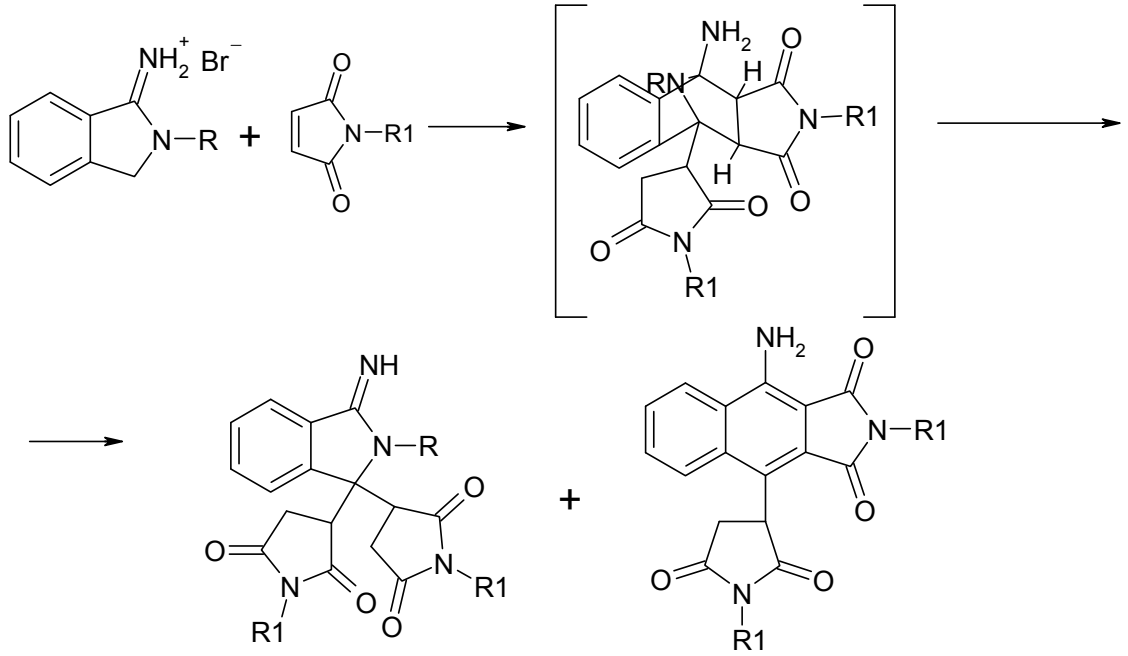
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail: grattacapo@rambler.ru

Похідні ізоіндолу мають різнопланову біологічну активність [1]. Зокрема цікавими з біологічної точки зору є продукти реакції похідних ізоіндолу з малеїнімідами – перегруповані аддукти Дільса-Альдера першого, другого та третього типів [2,3]. Особливу увагу привертають перегруповані аддукти Дільса-Альдера другого типу (2), які є потенційними маркерами біологічних молекул завдяки сильній флуоресценції [3].

Метою даної роботи було введення до складу відповідних перегрупованих аддуктів Дільса-Альдера (1) та (2) функціональних груп, що дозволяють прикріпляти одержані сполуки до біологічних молекул.

В ході роботи були введені в реакцію різноманітні похідні аміноізоіндолу в реакцію з малеїнімідами за різних умов.

В ході дослідження було показано утворення двох основних продуктів (1) та (2). За умови проведення реакції при нагрівання отримується суміш продуктів, а при низьких температурах вдалося виділити продукт(2) в індивідуальному стані. Одержання продукту було доведено спектральними методами.



(1) (2)

Таким чином, варіюючи умови вдалося провести реакцію хемоселективно, а саме єдиним продуктом мати структуру (2), що має флуоресцентні властивості.

Література:

1. *V.A. Kovtunenko, Z.V. Voitenko* // The Chemistry of Isoindoles - Russ. Chem. Rev. 1994,v. 63,p. 997-1018.
2. *I.V. Levkov, O.V. Turov, O.V. Shishkin , S.V. Shishkina , Z.V. Voitenko* // The Curtin–Hammett principle in action: 1-amino-3H-isoindole in cycloaddition reactions – Tetrahedron, 2010, v.66, p.508–512
3. *I.V.Levkov, Z.V.Voitenko, O.A.Zaporozhets, R.P.Linnik, S.V. Shishkina, O.V.Shishkin* // 4-Amino-benzo[*f*]isoindole derivatives: Synthesis and Fluorescence Properties – in press

REACTION PRODUCTS DERIVED FROM THE REACTION OF AMINOIZOINDOLS WITH MALEIMIDS AS POTENTIAL MARKERS FOR BIOLOGICAL MOLECULES

Krykun S.O., Yegorova T.V., Levkov I.V., Voitenko Z.V.

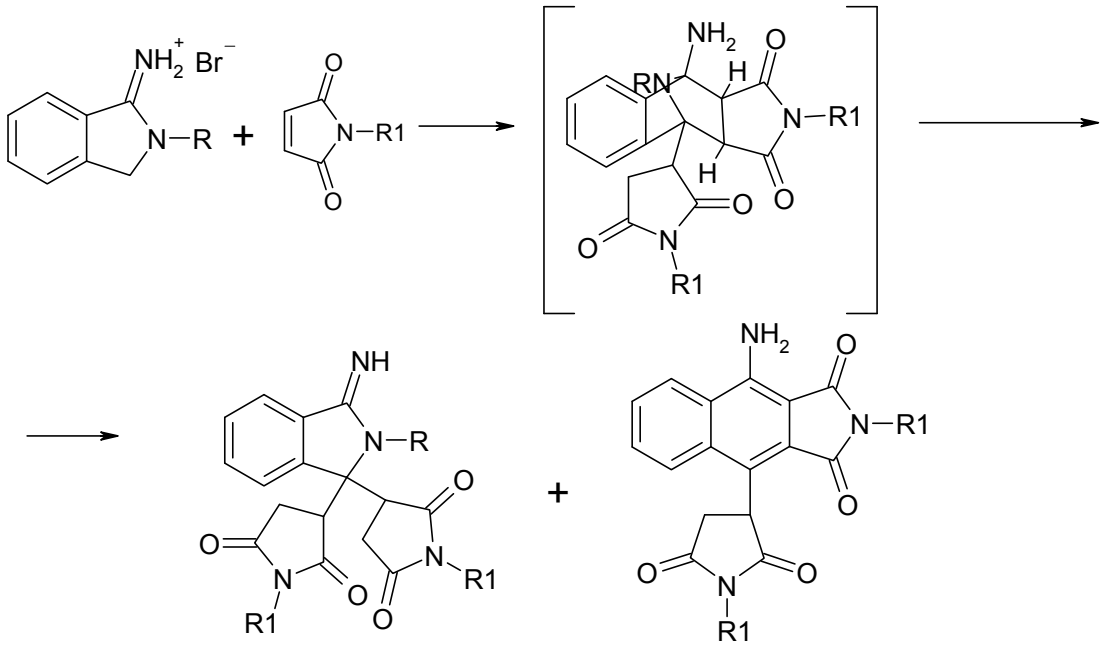
Kyiv National Taras Shevchenko University, Kyiv, Ukraine
e-mail: grattacapo@rambler.ru

Derivatives of isoindols have diverse biological activity [1]. Particularly interesting from a biological point of view are the reaction products derived from the interaction of isoindols with maleimids – rearranged Diels-Alders adducts of first, second and third types [2,3]. Particular attention is drawn by rearranged adducts of second type (2) that are potential markers for biological molecules due to a strong fluorescence [3].

The aim of this work was the insertion into the appropriate re-grouped Diels-Alder adducts (1) and (2) functional groups that allow attach derived compounds in biological molecules.

Reactions of various derivatives of aminoisoindols were carried with maleimids under different conditions.

Formation of two major products (1) and (2) was shown. The mixture of products was obtained, if the reaction was carried under heating, at low temperatures only (2) was obtained as an individual compound. Structures of the products were proved by spectroscopic methods.



(1) (2)

Thus, by varying the reaction conditions we were able to carry out the reactions chemoselective, getting selectively the product were shown to have structure (2), which has fluorescent properties.

References:

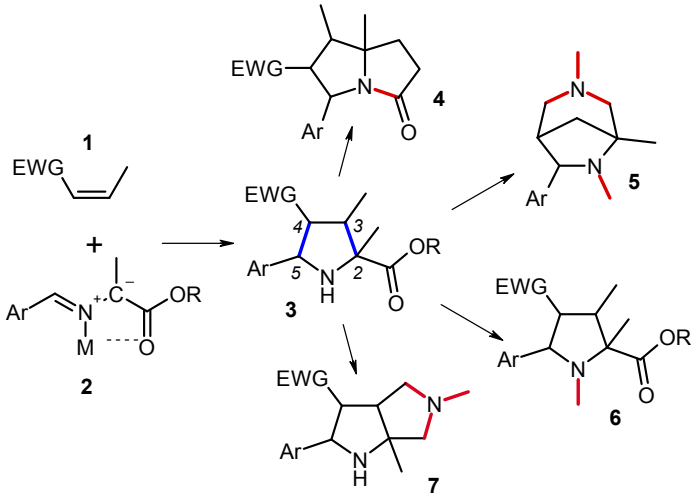
1. *V.A. Kovtunenko, Z.V. Voitenko* // The Chemistry of Isoindoles - Russ. Chem. Rev. 1994,v. 63,p. 997-1018.
2. *I.V. Levkov, O.V. Turov, O.V. Shishkin , S.V. Shishkina , Z.V. Voitenko* // The Curtin–Hammett principle in action: 1-amino-3H-isoindole in cycloaddition reactions – Tetrahedron, 2010, v.66, p.508–512
3. *I.V.Levkov, Z.V.Voitenko, O.A.Zaporozhets, R.P.Linnik, S.V. Shishkina, O.V.Shishkin* // 4-Amino-benzo[*f*]isoindole derivatives: Synthesis and Fluorescence Properties – in press

ДИЗАЙН БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ОСНОВЕ 5-АРИЛПРОЛИНОВОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО КАРКАСА

Кудрявцев К.В.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия
e-mail: kudr@org.chem.msu.ru

Взаимодействие электроноакцепторных алкенов (**1**) и азометиновых илидов (**2**) является рациональной стратегией синтеза функционализированных производных 5-арилпирролидин-2-карбоновых кислот (**3**) [1-5]. Получаемые соединения содержат молекулярный каркас 5-арилпролина, обладающий необходимыми физико-химическими параметрами для эффективного взаимодействия с различными биологическими мишенями и широкими возможностями для структурной модификации. Последующие внутри- и межмолекулярные конденсации функциональных групп в соединениях (**3**) приводят к образованию пирролизидинонов (**4**), 3,6-диазабицикло[3.2.1]октанов (**5**), различных N-замещенных 5-арилпролинов (**6**), октагидропирроло[3,4-*b*]пирролов (**7**). В ходе проведения биологического скрининга были идентифицированы новые классы низкомолекулярных органических соединений (**3**-**7**), проявляющие различные виды активности.



Биологическая активность синтезированных соединений:

- ингибиторы сортазы А *S. aureus*;
- ингибиторы тромбина (фактора IIa);
- ингибиторы прокоагулянтной активности тромбоцитов;
- протекторы пролонгированного окислительного стресса.

В докладе будут обсуждены взаимосвязи между структурой полученных соединений и проявляемой ими биологической активностью и дальнейшая структурная модификация, направленная на разработку инновационных лекарственных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 09-03-92011-ННС_а, 11-03-00630-а).

Литература:

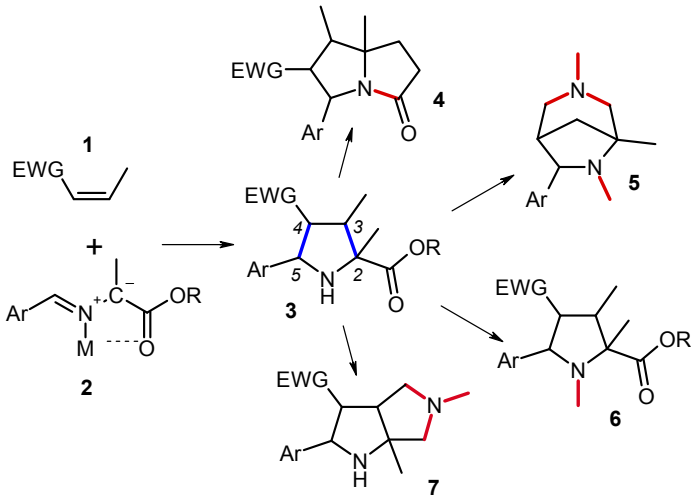
1. *K.V. Kudryavtsev, M.Yu. Tsentalovich, A.S. Yegorov, E.L. Kolychev.* // Highly Diastereoselective Synthesis of Chimeras of Proline and Glutamate - J. Heterocyclic Chem., 2006, v. 43, p. 1461-1466.
2. *K.V. Kudryavtsev, M.L. Bentley, D.G. McCafferty.* // Probing of the *cis*-5-Phenyl Proline Scaffold as a Platform for the Synthesis of Mechanism-Based Inhibitors of the Staphylococcus aureus Sortase SrtA Isoform - Bioorg. Med. Chem., 2009, v. 17, p. 2886-2893.
3. *K.V. Kudryavtsev.* // Efficient Synthesis of Functionalized Diazacyclopenta[*c*]pentalene with Multiple Intermolecular Interactions in Crystal - Heterocycles, 2011, v. 83, p. 323-330.
4. *К.В. Кудрявцев.* // Синтез мостиковых гетероциклов из *цис*-2,4-пирролидиндикарбоновых кислот: I. 3,6-диаза-бицикло[3.2.1]октаны - Журн. орг. химии, 2010, т. 46, с. 379-386.
5. *К.В. Кудрявцев, Н.В. Нуколова, О.В. Кокорева, Е.С. Смолин.* // Стереоселективный синтез функционализированных производных 2-(2-карбоксиэтил)пирролидин-2-карбоновой кислоты - Журн. орг. химии, 2006, т. 42, с. 424-434.

DESIGN OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS BASED ON 5-ARYL PROLINE SCAFFOLD

Kudryavtsev K.V.

M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow, Russia
e-mail: kudr@org.chem.msu.ru

Interaction of electron-deficient olefins (**1**) and azomethine ylides (**2**) is an efficient strategy for synthesis of functionalized derivatives of 5-arylpyrrolidine-2-carboxylic acids (**3**) [1-5]. Synthesized compounds contain 5-arylproline molecular scaffold with particular physico-chemical characteristics providing effective interactions with different biological targets and structural modifications potential. Subsequent intra- and intermolecular functional groups condensations in compounds (**3**) lead to pyrrolizidinones (**4**), 3,6-diazobicyclo[3.2.1]octanes (**5**), diverse N-substituted 5-arylprolines (**6**), octahydropyrrolo[3,4-*b*]pyrroles (**7**). Novel small-molecule compounds classes (**3**-**7**) with interesting activity were identified during biological screening.



Biological activity of synthesized compounds:

- inhibitors of *S. aureus* sortase A;
- inhibitors of thrombin (factor IIa);
- inhibitors of platelets procoagulant activity;
- protectors of prolonged oxidative stress.

Structure-activity relationships (SARs) and structural modifications directed to the innovative drugs development will be discussed in the report.

Financial support of the Russian Foundation for Basic Research (grants 09-03-92011-HHC_a, 11-03-00630-a) is acknowledged.

References:

1. *K.V. Kudryavtsev, M.Yu. Tsentalovich, A.S. Yegorov, E.L. Kolychev.* // Highly Diastereoselective Synthesis of Chimeras of Proline and Glutamate - J. Heterocyclic Chem., 2006, v. 43, p. 1461-1466.
2. *K.V. Kudryavtsev, M.L. Bentley, D.G. McCafferty.* // Probing of the *cis*-5-Phenyl Proline Scaffold as a Platform for the Synthesis of Mechanism-Based Inhibitors of the Staphylococcus aureus Sortase SrtA Isoform - Bioorg. Med. Chem., 2009, v. 17, p. 2886-2893.
3. *K.V. Kudryavtsev.* // Efficient Synthesis of Functionalized Diazacyclopenta[*c*]pentalene with Multiple Intermolecular Interactions in Crystal - Heterocycles, 2011, v. 83, p. 323-330.
4. *K.V. Kudryavtsev.* // Synthesis of Bridged Heterocycles from *cis*-Pyrrolidine-2,4-dicarboxylic Acids: I. 3,6-Diaza-bicyclo[3.2.1]octanes - Russ. J. Org. Chem., 2010, v. 46, p. 372-379.
5. *K.V. Kudryavtsev, N.V. Nukolova, O.V. Kokoreva, E.S. Smolin.* // Stereoselective Synthesis of Functional Derivatives of 2-(2-Carboxyethyl)pyrrolidine-2-carboxylic Acid - Russ. J. Org. Chem., 2006, v. 42, p. 412-422.

ОБРАЗОВАНИЕ АМИДНОЙ СВЯЗИ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ДЕСТРУКЦИИ ХИТОЗАНА

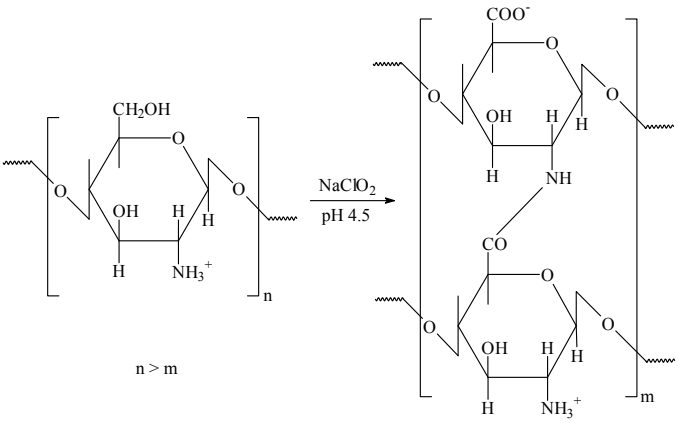
Курамшина А.Р., Муринов Ю.И., Кабальнова Н.Н.

Институт органической химии Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, Россия
e-mail: oxboss@anrb.ru, chemox@anrb.ru

Неослабевающий интерес науки и промышленности к поиску возобновляемых биополимеров природного происхождения, таких как хитозан и его производным связан, прежде всего, с уникальностью его свойств: высокой биологической активностью, биосовместимостью с тканями человека, животных и растений, экологически чистыми по отношению к окружающей среде, возможностью применения в проведении природоохранных мероприятий.

Физико-химические свойства хитозана, его производных и водорастворимых олигомеров хитозана позволяют использовать их при разработке лекарственных форм в качестве пролонгирующих средств, что способствуют более эффективному введению биологически активных соединений в организм, их пролонгированному высвобождению. Наличие в модифицированных производных хитозана функциональных групп усиливают физико-химические свойства, значительно расширяя спектр их применения.

Мы обнаружили, что при окислительной деструкции хитозана в некоторых случаях (под действием озона, перекиси водорода, NaClO, $NaClO_2$, ClO_2) наблюдается образование амидной связи. Образование амидной связи важная реакция в органическом синтезе и протекает либо в жестких условиях, либо каталитически при участии активирующих реагентов. Наблюдаемое нами образование амидной связи протекает в мягких условиях при окислительной деструкции хитозана или при выделении продукта реакции. Формирование амидной связи подтверждено методами ИК и ЯМР ^{13}C, потенциометрического титрования. Обращенная газовая хроматография является удобным методом для исследования модификации и деструкции биополимера. В настоящей работе данный метод применяется для изучения адсорбционных свойств хитозана и его модифицированного аналога на примере адсорбции некоторых н-алканов и н-спиртов. Показано, что способность адсорбентов к дисперсионным взаимодействиям выше на модифицированном хитозане. При окислении хитозана происходит окислительная деструкция по 1,4-*β*-гликозидной связи и образование карбоксильных групп при С (6) атоме углерода с образованием амидной связи, например:



FORMATION OF AMIDE BONDS DURING THE OXIDATIVE DEGRADATION OF CHITOSAN

Kuramshina A.R., Murinov Y.I., Kabal'nova N.N.

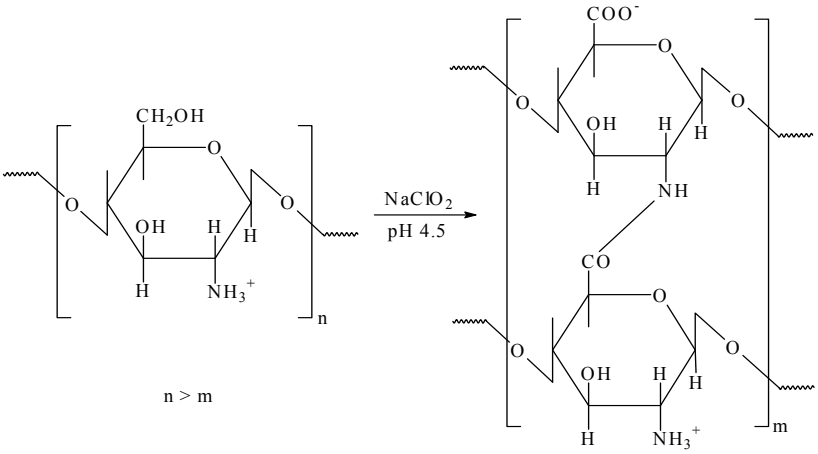
Institute of Organic Chemistry, Ufa Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

e-mail: oxboss@anrb.ru, chemox@anrb.ru,

The indefatigable interest of a science and the industry to search of renewable biopolymers of a natural origin, such as chitosan and its derivatives is connected, first of all, with uniqueness of its properties: high biological activity, biocompatibility with fabrics of the human, animals and plants, non-polluting in relation to environment, application possibility to carrying out of nature protection actions. The unique physicochemical properties of chitosan, its derivatives and water-soluble oligomers allow to use them as supports, prolongating the action of medicine forms. The presence of functional groups in the modified chitosan derivatives increases the physical and chemical properties of the polymer allow significantly expand the range of their application. We found that in the reactions of the destruction and oxidation of chitosan by the different reagents (ozone, hydrogen peroxide, NaClO, $NaClO_2$, ClO_2) can be occur amide bond formation.

The formation of the amide bond is an important reaction in organic synthesis and occurs either in hard conditions or catalytically and with the participation of activating reagents. We observed the formation of amide bonds under mild conditions by oxidative degradation of chitosan or separation of the reaction product. Formation of the amide bond was shown by the methods of IR and ^{13}C NMR, potentiometric titration.

The inverse gas chromatography (IGC) is a useful method to observe the interaction between polymer and solutes. In the present work the given method is applied for study of adsorption properties of chitosan and its modified analogue in relation to some *n*-alkanes and *n*-alcohols. It is shown, that ability of adsorbents to dispersive interactions with test probes is higher on the modified chitosan. The amide bond formation were observed when the chitosan oxidation occur which rupture of glycoside bond and formation of the carboxyl groups at C(6), for example:

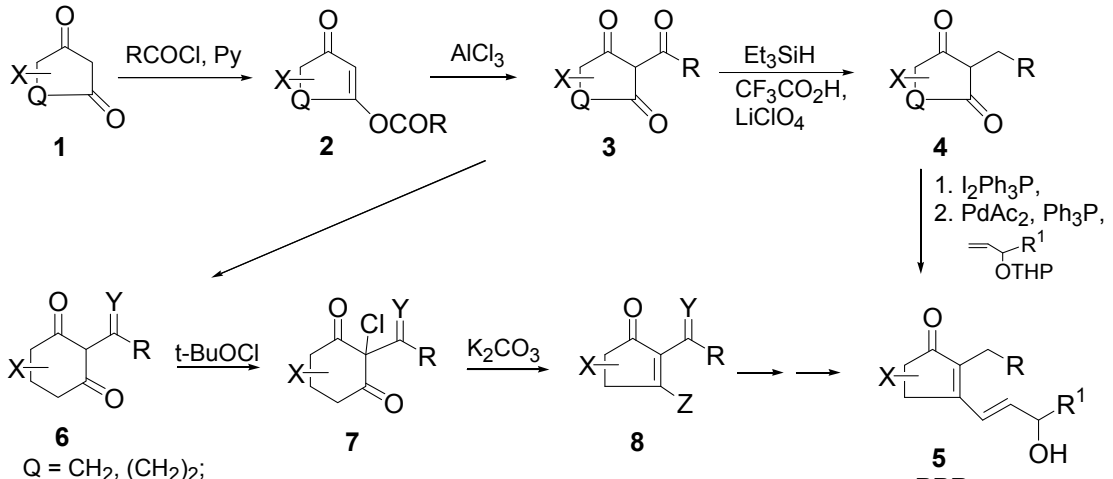


СИНТЕЗ ФИТОПРОСТАНОИДОВ НА ОСНОВЕ 2-АЦИЛЦИКЛОАЛКАН-1,3-ДИОНОВ

Лахвич Ф.А., Рубинов Д.Б., Рубинова И.Л.

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: rubinov@iboch.bas-net.by, info@iboch.bas-net.by

Фитопростаны по химической структуре являются вицинально замещенными циклопентаноидами и представляют собой важный класс растительных вторичных метаболитов неэнзиматического липидного перокисления α- и γ-линоленовых кислот. Эти соединения являются маркерами стрессовых ситуаций и участвуют в осуществлении своеобразного «растительного иммунитета» [1]. Биологическая функция фитопростанов до сих пор нуждается в выяснении. Поскольку они содержатся в продуктах питания человека, то остается важным также изучение спектра фармакологической активности, проявляемой различными классами природных фитопростанов. Получение замещенных циклопентанонов и их дальнейшее превращение в фитопростаны и их аналоги до сих пор представляет собой совокупность технически сложных и не всегда препаративных химических процессов.



Q = CH_2, $(CH_2)_2$;
X = H, алкил, алкоксикарбонил,арил, гетероциклил;
Y = H_2, NOEt;
Z = H, Cl, OH

тип I R = $C_6H_{12}COOH$, R^1 = C_2H_5
тип II R = CH_3, R^1 = $C_7H_{14}COOH$

В ИБОХ НАН Беларуси ведутся интенсивные исследования по полному синтезу природных биологически активных веществ различных классов (стероиды, антибиотики, простаноиды, феромоны и кайромоны насекомых, регуляторы роста растений и др.) на основе 2-ацилциклоалкан-1,3-дионов **(3).** При этом циклогексановые производные как синтоны гораздо более доступны по сравнению с циклопентановыми [2]. Их реакционная способность и хорошо разработанные методы химической трансформации [3,4] позволяют получать соединения (6) и (7) с многообразной функционализацией как по циклу так и боковой цепи, которые далее легко могут быть трансформированы в 2,3,4-замещенные циклопентаноновые производные **(8)** под действием оснований.

Литература:

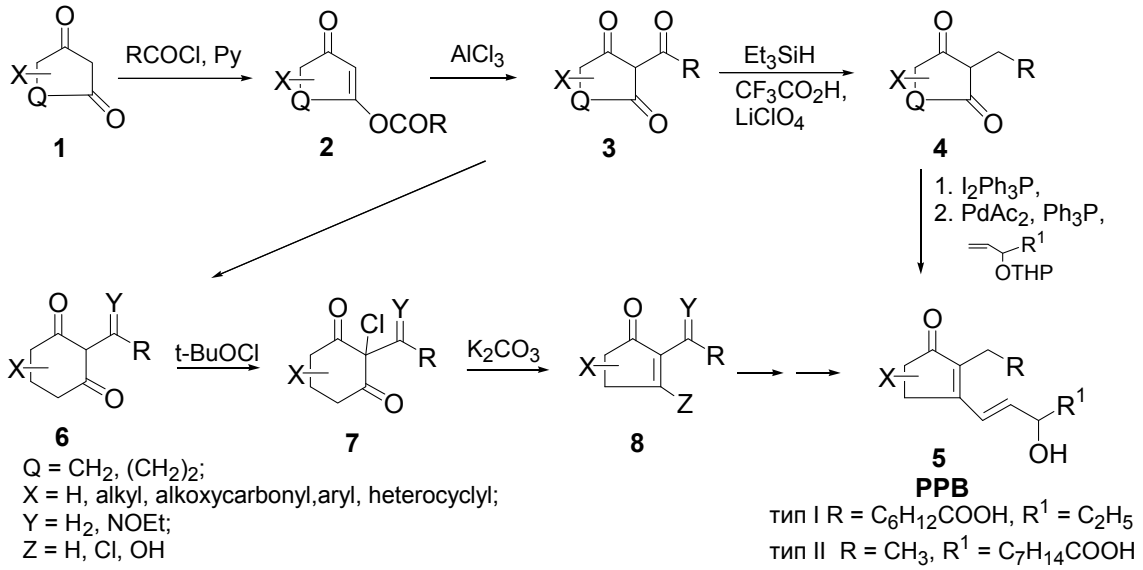
1. *Thoma I., Krischke M., Loeffler C., Mueller M.J.* // The isoprostanoid pathway in plants - Chem. Phys. Lipids, 2004, № 128, с. 135-148; б) Schmidt A., Boland W. // General strategy for the synthesis of B_1 phytoprostanes, dinor isoprostanes and analogs - J. Org. Chem., 2007, v. 72, № 5, p. 1699-1706.
2. *Akhrem A. A., Lakhvich F. A., Budai S. I, Khlebnikova T. S., Petrusevich I. I.* // A new simple synthesis of 2-acylcyclohexane-l,3-diones - Synthesis, 1978, № 12, с. 925-927.
3. *Rubinov D.B., Rubinova I.L., Akhrem A.A.* // Chemistry of 2-acylcycloalkane-1,3-diones - Chem. Rev., 1999, V. 99, № 4. -p. 1047-1065.
4. *Исакова В.Г, Хлебникова Т.С., Лахвич Ф.А.* // Химия фторзамещенных β-дикетонов и их производных - Успехи химии, 2011, т. 79, № 10, 929-960.

SYNTHESIS OF PHYTOPROSTANOIDS ON THE BASE OF 2-ACYLCYCLOALKANE -1,3-DIONES

Lakhvich F. A., Rubinov D.B., Rubinova I.L.

Institute of bioorganic chemistry of the National academy of sciences of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: rubinov@iboch.bas-net.by, info@iboch.bas-net.by

According their chemical structure phytoprostanes are vicinal substituted cyclopentanoids and represent an important class of plant secondary metabolites of non-enzymatic lipid peroxidation of α- and γ-linolenic acid. These compounds arise as the plant stress markers and have been involved into a kind of "plant immunity" [1]. The biological function of phytoprostanes still needs to be clarified. Because of their occurence in human food, it is also important to study the pharmacological activity of various classes of natural phytoprostanes. The preparation of substituted cyclopentanone and their further transformation into phytoprostanes and their analogues are still to be a set of technically complex and not always preparative chemical procedures.



Q = CH_2, $(CH_2)_2$;
X = H, alkyl, alkoxycarbonyl,aryl, heterocyclyl;
Y = H_2, NOEt;
Z = H, Cl, OH

тип I R = $C_6H_{12}COOH$, R^1 = C_2H_5
тип II R = CH_3, R^1 = $C_7H_{14}COOH$

In IBOCh of NASB there are carried out an intensive research upon the total synthesis of natural biologically active substances of different classes (steroids, antibiotics, prostanoids, pheromones and kairomons, plant growth regulators, etc.) on the base of 2-acylcycloalkan-1 ,3-diones (3). In this case cyclohexane derivatives are much more appropriate as synthons compared to cyclopentane ones [2]. Their reactivity and well-developed methods of chemical transformation [3,4] allow to obtain compound (6) and (7) with various functionalization of both the cycle and the side chain, which then can be easily transformed into 2,3,4-substituted cyclopentanoid derivatives (8) by the action of bases.

References:

1. *Thoma I., Krischke M., Loeffler C., Mueller M.J.* // The isoprostanoid pathway in plants - Chem. Phys. Lipids, 2004, № 128, c. 135-148; б) Schmidt A., Boland W. // General strategy for the synthesis of B_1 phytoprostanes, dinor isoprostanes and analogs - J. Org. Chem., 2007, v. 72, № 5, p. 1699-1706.
2. *Akhrem A. A., Lakhvich F. A., Budai S. I, Khlebnikova T. S., Petrusevich I. I.* // A new simple synthesis of 2-acylcyclohexane-l,3-diones - Synthesis, 1978, № 12, c. 925-927.
3. Rubinov D.B., Rubinova I.L., Akhrem A.A. // Chemistry of 2-acylcycloalkane-1,3-diones - Chem. Rev., 1999, V. 99, № 4. -p. 1047-1065.
4. *Isakova V.G, Khlebnikova T. S., Lakhvich F. A.* // Chemistry of fluorsubstituted β-diketones and their derivatives – Russian Chem. Rev., 2011, т. 79, № 10, 929-960.

ПОИСК НОВЫХ АНТИДЕПРЕССАНТОВ СРЕДИ ПРОДУКТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТИЕТАНИЛТРИАЗОЛОВ С НУКЛЕОФИЛАМИ

Макарова Н.Н., Гильманова А.Г., Халиуллин Ф.А., Клен Е.Э., Никитина И.Л., Иванова О.А., Алехин Е.К.

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия
e-mail: khaliullin_ufa@yahoo.com

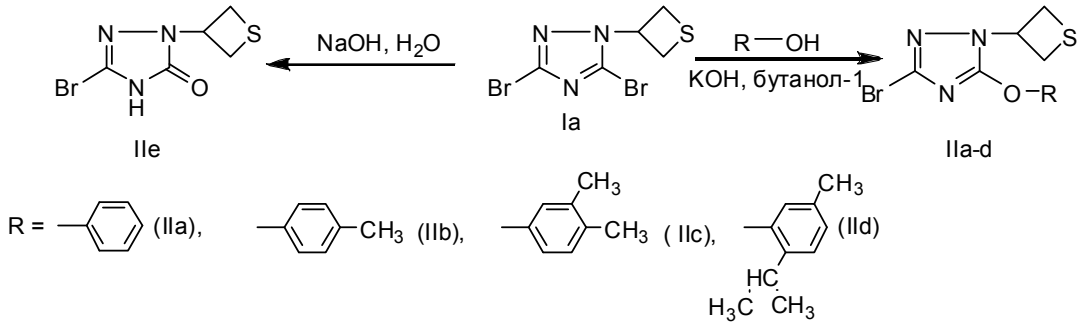
Проблема создания лекарственных препаратов, обладающих антидепрессивным действием, является актуальной. Перспективным направлением поиска новых антидепрессантов является исследование химических свойств 1-тиетанил-1,2,4-триазолов.

Ранее нами было установлено, что взаимодействие тиетансодержащих 1,2,4-триазолов со спиртами протекает неоднозначно как с образованием 5-алкокситриазолов, так и продуктов элиминирования тиетандиоксидного цикла – 3-алкокситиетан-1,1-диоксидов, у которых была обнаружена антидепрессивная активность. в скрининговых тестах in vivo.

В продолжение этих исследований были изучены реакции 3,5-дибром-1-(тиетанил-3)-1,2,4-триазола (Ia) и 3,5-дибром-1-(1,1-диоксотиетан-3-ил)-1,2,4-триазола (Iв) с фенолами и гидроксидами щелочных металлов.

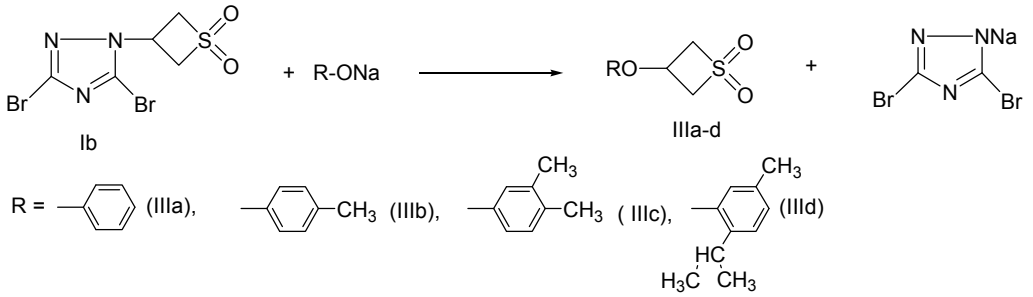
Установлено, что при кипячении 3,5-дибром-1-(тиетанил-3)-1,2,4-триазола (Ia) с фенолами или водным раствором гидроксида натрия происходит замещение атома брома по 5 положению триазольного кольца, и образуются соответственно 5-арилокси-3-бром-1-(тиетанил-3)-1,2,4-триазолы (IIa–d) и 5-бром-2-(тиетанил-3)-1,2,4-триазол-3-он (IIe) с выходами до 93% (схема 1).

Схема 1



При взаимодействии 3,5-дибром-1-(1,1-диоксотиетан-3-ил)-1,2,4-триазола (Iв) с фенолятами натрия происходит элиминирование тиетандиоксидного цикла, и образуются 3-арилокситиетан-1,1-диоксиды (IIa–d) с выходами 57 – 79% (схема 2). Реакция 3,5-дибром-1-(1,1-диоксотиетан-3-ил)-1,2,4-триазола (Iв) с водным раствором гидроксида натрия также протекает с элиминированием тиетандиоксидного цикла.

Схема 2



Индивидуальность синтезированных соединений подтверждена данными тонкослойной хроматографии, а их структура доказана методами ИК- и ЯМР ^{1}H- и ^{13}C- спектроскопии.

В результате скрининга новых производных 1,2,4-триазола и тиетан-1,1-диоксида в тестах принудительного плавания и подвешивания за хвост найдены соединения, обладающие антидепрессивной активностью, сравнимой с активностью флуоксетина - 5-бром-2-(тиетанил-3)-1,2,4-триазол-3-он (IIe) и 3-(2-*изо*-пропил-5-метилфенокси)тиетан-1,1-диоксид (IIId).

Таким образом, исследование реакций тиетанил-1,2,4-триазолов с нуклеофилами является перспективным для поиска новых антидепрессантов.

Литература:

1.*Клен Е.Э., Халиуллин Ф.А., Макарова Н.Н.* // Журн. орган. химии. 2008, 44, 1729-1732.

EARCH FOR NEW ANTIDEPRESSIVE COMPOUNDS AMONG REACTION PRODUCTS OF 1,2,4-TRIAZOLE BEARING THIETANE MOIETY WITH NUCLEOPHILES

Makarova N.N., Gilmanova A.G., Khaliullin F.A., Klen E.E., Nikitina I.L., Ivanova O.A., Alekhin E.K.

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia
e-mail: khaliullin_ufa@yahoo.com

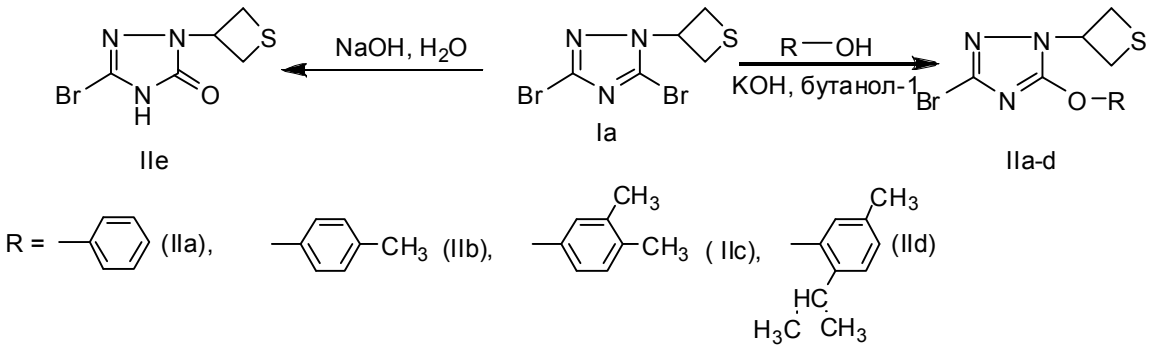
Design and synthesis of new antidepressive drugs is a very important problem. Perspective way to solve it is investigation of chemical properties of 1-thietanyl-1,2,4-triazoles.

In previous work was shown that reactions 1,2,4-triazoles bearing thietane moiety with alcohols proceeds ambiguously [1]. Depending on the reaction conditions the reaction led to the formation of 5-alkoxytriazoles as well as elimination products - 3-alkoxythietane 1,1-dioxides. Some of them were tested for antidepressive activity and showed promissing results.

In continuation of our research reactions of 3,5-dibromo-1-(thietanyl-3)-1,2,4-triazole (Ia) and 3,5-dibromo-1-(1,1-dioxidothietanyl-3)-1,2,4-triazole (Ib) with phenols and sodium hydroxide were investigated.

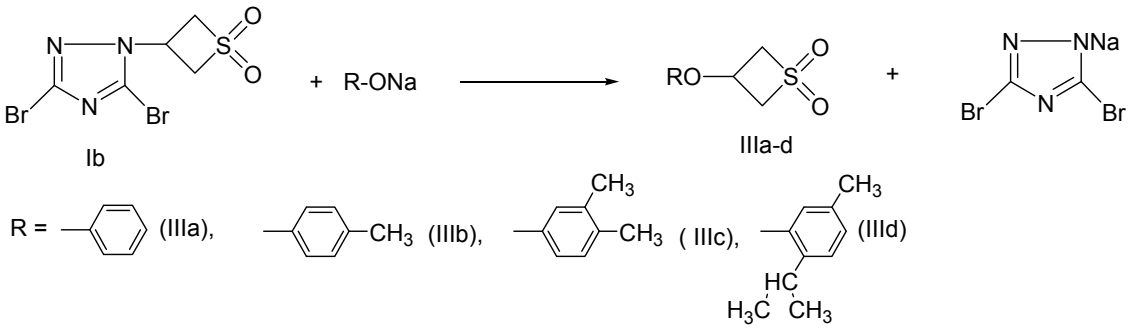
In case of 3,5-dibromo-1-(thietanyl-3)-1,2,4-triazole (Ia) reactions led to the substitution of bromine atom at position 5 of 1,2,4-triazole and corresponding 5-aryloxy- 3-bromo-1-(thietanyl-3)-1,2,4-triazoles (IIa–d) and 5-bromo-2-(thietanyl-3)-1,2,4-triazol-3-one (IIe) were obtained with yield to 93% (scheme 1).

Scheme 1



The reaction of 3,5-dibromo-1-(1,1-dioxidothietanyl-3)-1,2,4-triazole (Ib) with sodium phenolates led to elimination products - 3-aryloxythietane 1,1-dioxides (IIIa–d) with 57-79% yield (scheme 2). In case of aqueous sodium hydroxide elimination of thietane 1,1-dioxide was also observed.

Scheme 2



The structure of synthesized compounds were confirmed by elemental analysis and ^{1}H NMR, ^{13}C and IR spectroscopy.

Primary screening of 1,2,4-triazole and thietane 1,1-dioxide derivatives for antidepressant activity in forced swimming test and tail suspension test showed that 5-bromo-2-(thietanyl-3)-1,2,4-triazol-3-one (IIe) and 3-(2-iso-propyl-5-methylphenoxy)thietane 1,1-dioxides (IIId) have antidepressant activity comparable to fluoxetin.

In conclusion, investigation reactions of thietanyl-1,2,4-triazoles with nucleophilic reagents is perspective to antidepressive drug design.

References:

1.*Klen E.E., Khaliullin F.A., Makarova N.N.* // Russian Journal of Organic Chemistry. 2008, 44, 1729-1732.

2,3-ДИГІДРО-3-ГІДРОПЕРОКСИ-2-АРИЛ-4,5-ДИФЕНІЛІЗОТІАЗОЛ 1,1-ДІОКИДИ: ОДЕРЖАННЯ І ВИКОРИСТАННЯ В РЕАКЦІЇ ЕПОКСИДУВАННЯ

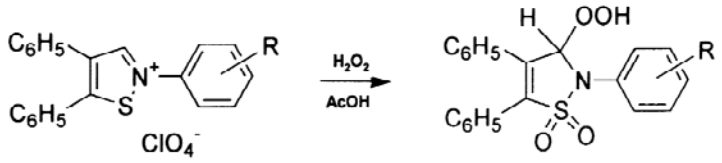
[1]Макота О., [2]Вольф Ж., [1]Трач Ю., [2]Шульце Б.

[1]Національний університет "Львівська політехніка, Львів, Україна
e-mail: makotaoksana@yahoo.com
[2]Інститут органічної хімії, Університет Лейпцига, Лейпциг, Німеччина

Сполуки, що містять сультам складову проявляють фармакологічну активність і є добре відомими прекурсорами для багатьох важливих реакцій окиснення. Виходячи з цього синтез цих сполук як і дослідження їх використання в різних органічних реакціях є цікавим. Серед цих сполук гідроперокси султами, що містять гідропероксидну групу є дуже привабливими як нові перспективні окисники для реакцій епоксидування.

Основним завданням цієї роботи є одержання гідроперокси сультамів, 2-(2-хлорофеніл)-2,3-дигідро-3-гідроперокси-4,5-дифенілізотіазол 1,1-діоксиду, 2-(2,6-дихлорофеніл)-2,3-дигідро-3-гідроперокси-4,5-дифенілізотіазол 1,1-діоксиду і 2-(2,6-дихлоро-4-нітрофеніл)-2,3-дигідро-3-гідроперокси-4,5-дифенілізотіазол 1,1-діоксиду, та їх використання в реакції епоксидування циклооктену в присутності ефективного каталізатора епоксидування бориду молібдену MoB.

Ізотіазольні солі **1** отримували шляхом міжмолекулярної циклоконденсації β-тіоціанотовініл альдегідів і відповідно заміщених анілінів в присутності надхлорної кислоти в оцтовій кислоті з виходами: **1a** (61%), **1b** (62%) і **1c** (51%). Окиснення 2-арил-4,5-дифенілізотіазольних солей **1** 30% H_2O_2 в льодяній оцтовій кислоті при кімнатній температурі приводило до утворення стабільних **2** з добрими виходами: 2-(2-хлорофеніл)-2,3-дигідро-3-гідроперокси-4,5-дифенілізотіазол 1,1-діоксиду (**2a**) (70%), 2-(2,6-дихлорофеніл)-2,3-дигідро-3-гідроперокси-4,5-дифенілізотіазол 1,1-діоксиду (**2b**) (70%) і 2-(2,6-дихлоро-4-нітрофеніл)-2,3-дигідро-3-гідроперокси-4,5-дифенілізотіазол 1,1-діоксиду (**2c**) (72%) після 72, 72 і 96 годин перемішування, відповідно, як показано нижче:



1 **2**

a: R = 2-Cl
b: R = 2,6-Cl_2
c: R = 2,6-Cl_2; 4-NO_2

Структура гідроперокси сультамів **2** була встановлена ІЧ і НМР спектроскопією та склад був підтверджений мас спектрометрією і елементним аналізом. ІЧ спектри сполук **2** мають дві адсорбційні полоси 1302–1316 і 1146–1160 $см^{-1}$ SO_2 груп, які є характерні для асиметричних і симетричних коливань 1,1-діоксидів, відповідно. Дві адсорбційні полоси NO_2 групи спостерігаються при 1335 і 1537 $см^{-1}$ в спектрі сполуки **2c**. В ^{1}H ЯМР спектрах гідроперокси сультамів **2**, типова адсорбція 3-H атому появляється при 6.49–6.60 ppm. ^{13}C ЯМР сигнали для C-3 при 92.5–95.0 ppm є характерні для сполук **2**.

Гідроперокси султами **2** були використані як епоксидуючі агенти в реакції епоксидування циклооктену каналізованій боридом молібдену. Реакція епоксидування проводилась протягом 40 хвилин в термостатованому скляному реакторі оснащеному зворотнім холодильником і магнітною мішалкою в атмосфері аргону при температурі 23°C. В реактор завантажували 0.005 г каталізатора, 0.3 мл циклооктену, 3.5 мл хлороформу як розчинника і 0.01 моль $л^{-1}$ речовини **2**. Додатково встановлено, що за відсутності каталізатора **2** не розкладається і епоксициклооктан не утворюється за умов проведення реакції.

Показано, що епоксициклооктан утворюється в ході реакції епоксидування циклооктену всіма дослідженими гідроперокси сультамами **2** каталізованій MoB. Це свідчить про те, що **2** можуть успішно використовуватись як окисники для реакції каталітичного епоксидування олефінів.

У випадку **2a** селективність утворення епоксиду (розрахована як співвідношення кількості утвореного епоксидну до кількості витраченого гідропероксиду) досягає 35% при конверсії гідроперокси сультаму 73%. В присутності **2b** і **2c** селективність утворення епоксициклооктану рівна 19 і 5% при конверсії гідропероксиду 41 і 47%, відповідно.

Можна зробити висновок, що окислювальна активність вивчених гідропероксисультамів **2** є різною і визначається природою замісників в ароматичному кільці звізаному з атомом азоту молекули гідро пероксиду. Гідроперокси сультам **2a**, що містить тільки один атом хлору в *орто*-положенні є найбільш активним окисником, тоді як **2c**, який містить три замісники – два атоми хлору і одну NO_2 групу, проявляє найнижчу активність серед досліджених гідроперокси сультамів в реакції епоксидування циклооктену в присутності MoB.

Робота виконана за підтримки ДААД і Graduiertenkolleg 378 "Mechanistische und Anwendungsaspekte nichtkonventioneller Oxidationsreaktionen".

2,3-DIHYDRO-3-HYDROPEROXY-2-ARYL-4,5-DIPHENYLISOTHIAZOLE 1,1-DIOXIDES: PREPARATION AND APPLICATION IN EPOXIDATION REACTION

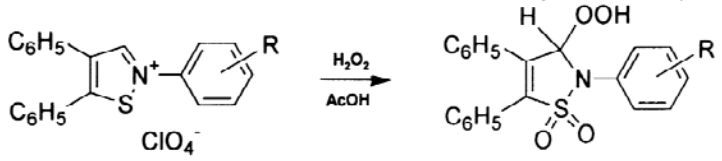
[1]Makota O., [2]Wolf J., [1]Trach Yu., [2]Schulze B.

[1]Lviv Polytechnic National University, Lviv, Ukraine. e-mail: makotaoksana@yahoo.com
[2]Institute of Organic Chemistry, Leipzig University, Leipzig, Germany

Compounds containing the sultam moiety have been found to possess pharmacological activity and are well known as precursors for a number of important oxidation reactions. Therefore the synthesis of families of these compounds as well as investigation of their application in different organic reactions has been of interest. Among these compounds hydroperoxy sultams containing hydroperoxy group are very attractive as a new perspective oxidant for the epoxidation reactions.

The purpose of this work is the preparation of hydroperoxy sultams, 2-(2-chlorophenyl)-2,3-dihydro-3-hydroperoxy-4,5-diphenylisothiazole 1,1-dioxide, 2-(2,6-dichlorophenyl)-2,3-dihydro-3-hydroperoxy-4,5-diphenylisothiazole 1,1-dioxide and 2-(2,6-dichloro-4-nitrophenyl)-2,3-dihydro-3-hydroperoxy-4,5-diphenylisothiazole 1,1-dioxide, and their application in the epoxidation reaction of cyclooctene in the presence of the effective epoxidation catalyst, molybdenum boride MoB.

The isothiazolium salts **1** were prepared by intramolecular cyclocondensation of β-thiocyanatovinyl aldehydes and the suitably substituted anilines in the presence of perchloric acid in acetic acid with yields: **1a** (61%), **1b** (62%) and **1c** (51%). The oxidation of 2-aryl-4,5-diphenyl substituted isothiazolium salts in glacial acetic acid with 30% H_2O_2 at room temperature gave stable hydroperoxy sultams **2** in good yields: 2-(2-chlorophenyl)-2,3-dihydro-3-hydroperoxy-4,5-diphenylisothiazole 1,1-dioxide (**2a**) (70%), 2-(2,6-dichlorophenyl)-2,3-dihydro-3-hydroperoxy-4,5-diphenylisothiazole 1,1-dioxide (**2b**) (70%) and 2-(2,6-dichloro-4-nitrophenyl)-2,3-dihydro-3-hydroperoxy-4,5-diphenylisothiazole 1,1-dioxide (**2c**) (72%) after 72, 72 and 96 hours stirring, respectively, as is shown below:



1 **2**

a: R = 2-Cl
b: R = 2,6-Cl_2
c: R = 2,6-Cl_2; 4-NO_2

The structures of hydroperoxy sultams **2** were established by IR and NMR spectroscopy and composition was confirmed by mass spectrometry and elemental analysis. The IR spectra of compounds **2** show two absorption bands at 1302–1316 and 1146–1160 cm^{-1} for SO_2 groups which are characteristic for the antisymmetric and symmetric vibrations of the 1,1-dioxides, respectively. The two absorption bands for NO_2 group are observed at 1335 and 1537 cm^{-1} in the spectrum of compound **2c**. In ^1H NMR spectra of hydroperoxy sultams **2**, the typical absorption of 3-H atom appears at 6.49–6.60 ppm. The ^{13}C NMR signals for C-3 at 92.5–95.0 ppm are characteristic for compounds **2**.

The hydroperoxy sultams **2** were used as epoxidation agents in the epoxidation reaction of cyclooctene catalyzed by molybdenum boride. The epoxidation reaction was carried out for 40 mitutes 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 MoB, 0.3 ml of cyclooctene, 3.5 ml chloroform as solvent and 0.01 mol l^{-1} of **2**. Additionally, it was established that in the absence of catalyst **2** does not decompose and epoxycyclooctane is not formed under the reaction conditions.

It was shown that epoxycyclooctane is formed in the epoxidation reaction of cyclooctene by all investigated hydroperoxy sultams **2** catalyzed by MoB. It indicates that **2** can be successfully used as oxidant in the catalytic epoxidation reaction of olefins.

In the case of **2a** the selectivity of epoxide formation (calculated as ratio of formed epoxide quantity to consumed hydroperoxide quantity) reaches 35% at hydroperoxy sultam conversion of 73%. In the presence of **2b** and **2c** the selectivity of epoxycyclooctane formation is 19 and 5% at hydroperoxide conversion of 41 and 47%, correspondingly.

One can conclude that oxidation activity of studied hydroperoxy sultams **2** is different and is defined by the nature of the substituents on the aromatic ring connected at nitrogen atom of hydroperoxide molecule. Hydroperoxy sultam **2a** containing only one *ortho*-chlorine atom is the most active oxidant, whereas **2c** which contains three substituents - two chlorine atoms and one NO_2 group, exhibites the lowest activity among investigated hydroperoxy sultams in the epoxidation reaction of cyclooctene in the presence of MoB.

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

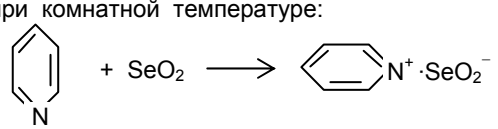
СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СЕЛЕНОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ АЦЕТИЛЕНОВОГО РЯДА

Мамедов Э.Ш., Велиева Д.С., Кулибекова Т.Н., Гюльахмедова С.А., Сафаралиева З.С.

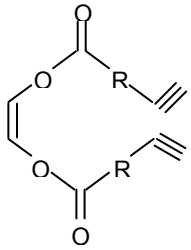
Институт Химических Проблем им. М.Ф.Нагиева Национальной АН Азербайджана, Баку, Азербайджан
e-mail: keb-chemistry@rambler ru

Интересным классом органических соединений являются бетаины, которые, являясь составной частью некоторых смесей, находят широкое применение как в косметической промышленности, так и в технике. Полученные нами бетаины были использованы в качестве промежуточных продуктов для синтеза новых селеноорганических соединений с тройной связью.

В качестве селенирующего агента взята двуокись селена, взаимодействие которой с олефинами приводит обычно к продуктам окисления. Нам удалось модифицировать SeO_2 за счет комплексообразования ее с нуклеофильным реагентом – пиридином – смешением эквимолярных количеств исходных реагентов при комнатной температуре:

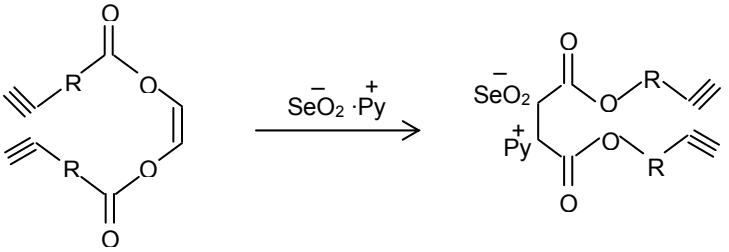


В спектре ПМР комплекса (соединение I) наблюдается сдвиг сигналов протонов атома в слабом поле на 0,8 м.д. по сравнению с сигналами протонов самого нуклеофила. Это свидетельствует о локализации заряда атома азота амина за счет образования донорно-акцепторного комплекса с переносом заряда. На основе полученного комплекса изучено сопряженное присоединение селенодиоксидной и пиридиновой групп к соединениям, содержащим одновременно двойную и тройную связи (соединения II, III, IV):



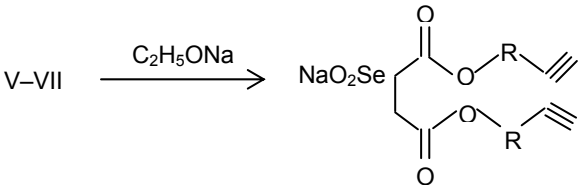
II–IV R = CH_2 (II), $CH_2OCH_2CH_2$ (III), $C(CH_3)_2$ (IV).

В результате реакции получены соответствующие селенитные бетаины (соединения V–VII), устойчивые при 0^0C и разлагающиеся на воздухе:



V–VII

Действие этилата натрия на бетаины (V–VII) приводит к образованию селенитов (VIII–X) с двойной и тройной связью в цепи:



VIII–X

Полученные вещества, имеющие в своем составе такие активные центры, как атом селена, двойную и тройную связи, были испытаны для выявления их биологической активности на тест культурах: St. Aureus, Ech. coli, Ps. aerogen. и дрожжевой гриб рода Candida. Полученные результаты показали, что по своей антимикробной активности они превосходят известные препараты.

SINTESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY SELENORGANIC KOMPLEKSIS OF ATYTHLENE NUMBER

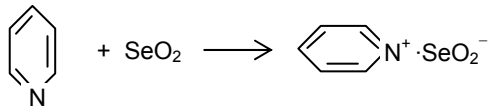
Mamedov E.Sh., Veliyeva D.S., Kulibekova T.N., Gulakhmedova S.A., Safaraliyeva Z.S.

The Institute of Chemical Problems of ANAS, Baku, Azerbayjan
e-mail: keb - chemistry@rambler ru

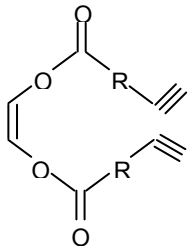
An interesting class of organic complexes represent betaines , which being a composite part of some mixtures, have found a wide application both in cosmetic industry and in technics. The obtained by us betaines have been used as an intermediate product in order to synthesize some new seleno – organic compelexes with a triple connection.

As a selenizing agent we have taken selenium dioxide, the interaction of which with olefines usually leads to the products of oxidation. We succeeded in modifying SeO_2 at the expense of its com-

plexformation with nucleophile reagent – pyridine – by mixing equimolar quantities of initial reagents as room temperature :

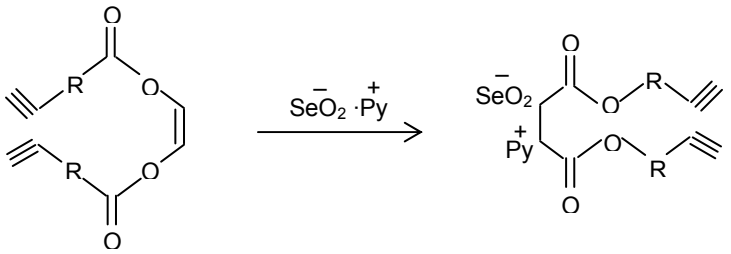


In the spectrum of PMR complex (connection I) one can observe the shift of the signals of the atom's protons to the weak field on 0,8m.d. as compared with the signals of the protons of the nucleophile itself. It affirms the fact of the charge localization on the atom of nitrogen amine at the expense of formation the donor – accepting complex with the charge transference. On the base of the obtained complex there has been investigated the conjugated joining of seleno – oxide and pyridine groups to the connections which at the same time contain double and triple links (connections II, III, IV) :



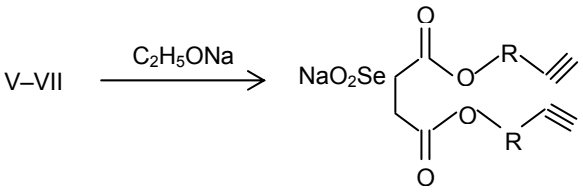
II–IV R = CH_2 (II), $CH_2OCH_2CH_2$ (III), $C(CH_3)_2$ (IV).

As a result of the reaction we obtained corresponding selenite betaines (connections V – VII) stable at 0 ^{o}C and decomposing in the air :



V–VII

The influence of natrium ethylate upon the betaines (V – VII) leads to the formation of selenites (VIII – X) with double and triple links in the chain :



VIII–X

The obtained substances, having in their composition such active centres as the atom of selen, double and triple links, have been tested in order to display their biological activity at the test – crops : St. aureus, Ech. coli, Ps. aerogen. And yeast fungus of the kind Candida. The obtained results have shown that according to their antimicrobe activity they surpass the well – known preparations.

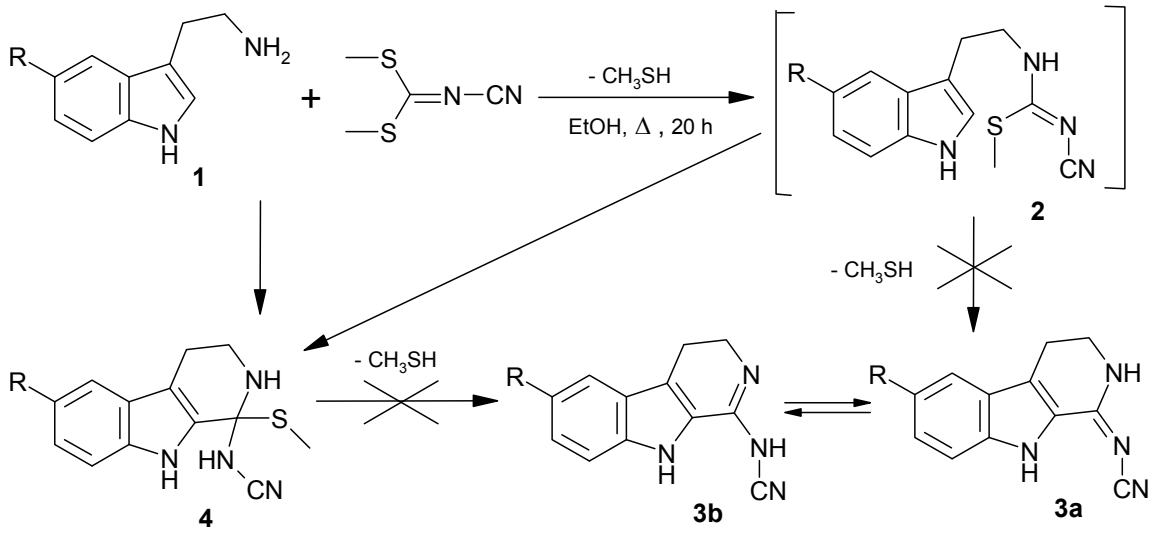
НОВЫЙ ПОДХОД К СИНТЕЗУ ПРОИЗВОДНЫХ В РЯДУ ТЕТРАГИДРО-β-КАРБОЛИНОВ

Медведева С.М., Шихалиев Х.С.

Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия
e-mail: chocd261@chem.vsu.ru

Неослабевающий интерес к развитию новых подходов к синтезу различных производных тетрагидро-β-карболина обусловлен общеизвестной биологической активностью природных и синтетических соединений, содержащих фармакоформные индольный и тетрагидропиридиновый фрагменты [1, 2]. В связи с этим, тетрагидро-β-карболины являются перспективным классом веществ для дальнейшего изыскания лекарственных средств. Поэтому создание новых подходов, которые позволили бы расширить возможности конструирования производных этого ряда веществ является актуальным.

Одним из распространенных методов синтеза тетрагидро-β-карболинового цикла является взаимодействие триптаминов с различными циклизующими агентами. В частности нашла достаточно широкое применение реакция Пикте-Шпенглера, в основе которой лежит взаимодействие триптаминов с карбонильными соединениями. В данной работе в качестве циклизующего агента был выбран N-цианимидо-S,S-диметилдитиокарбонат. Установлено, что для всех триптаминов 1 реакция легко проходит при кипячении в этаноле и завершается в течение 10-15 ч. Очевидно, взаимодействие начинается с атаки аминогруппы триптамина метилтиогруппой реагента, с отщеплением молекулы метилмеркаптана, что дает промежуточный 2-метил-N'-циано-N-[2-(1H-индол-3-ил)этил]имидотиокарбамат 2. Далее циклизация проходит не за счет ожидаемого отщепления второй молекулы метилмеркаптана и образования 2,3,4,9-тетрагидро-1H-β-карболин-1-илиденцианамида 3a, а в результате присоединения атома водорода находящегося у атома углерода индольного цикла к атому азота имидной группы и замыкания углерод-углеродной связи. При этом с выходами, доходящими до 95%, были получены 3[1-(метилтио)-2,3,4,9-тетрагидро-1H-β-карболин-1-ил]цианамиды 4.



R = H, Me, MeO, F, Cl

Строение соединений **4** подтверждено данными ^{1}H ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрометрии. Исходя из структуры соединений **4,** можно предположить возможность отщепления второй молекулы метилмеркаптана, за счет атома водорода эндоциклической или экзоциклической аминогрупп, что должно привести к 4,9-дигидро-3*H*-β-карболин-1-илцианамидам **3b** или таутомерам **3a**, соответственно. Однако этого не происходит даже в жестких условиях.

Для всех полученных соединений осуществлен виртуальный скрининг с помощью программы PASS, разработанной в ИБМХ РАМН (г. Москва http://www.msk.ru./PASS/). Компьютерное прогнозирование предсказало с вероятностью, превышающей 80%, что эти соединения будут стимулировать высвобождение серотонина, а также могут найти применениев качестве лекарственных средств при лечении психосексуальной дисфункции.

Литература:

1.*Дуленко и др.,* β-Карболины. Химия и нейробиология, - Киев: Изд-во Наук. думка, 1992, 216 с.
2.*Brian E. Love,* Synthesis of Carbolines Possessing Antitumor Activity, *Top Heterocycl Chem*, 2006 *2* 93-128.

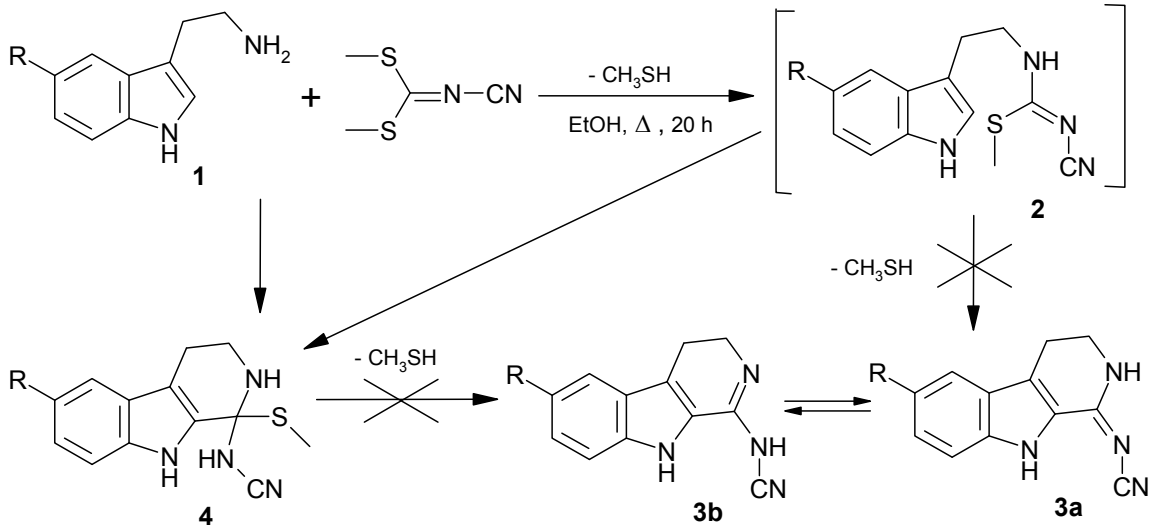
NEW APPROACH TO SYNTHESIS OF DERIVATIVES AMONG OF TETRAHYDRO-β-CARBOLINES

Medvedeva S.M., Shikhaliev Kh.S.

Voronezh state university, Voronezh, Russia
e-mail: chocd261@chem.vsu.ru

Indefatigable interest to development of new approaches to synthesis of various derivatives of tetrahydro-β-carbolines is caused by well-known biological activity of the natural and synthetic compounds containing pharmaceutical activity indoles and tetrahydropyridines fragments [1, 2]. In this connection, tetrahydro-β-carbolines are a perspective class of substances for the further research of medical products. Therefore creation of new approaches which would allow expanding possibilities of designing of derivatives of it of some compounds is actual.

One of widespread methods of synthesis tetrahydro-β-carbolines cycle is interaction tryptamine with various cyclizationes agents. Wide enough application reaction of Pictet-Spengler in which basis interaction tryptamines with carbonyl compounds lies in particular has found. In the given work in quality of cyclizationes agent has been chosen N-cyanoimido-S,S-dimethyldithiocarbonate. It is established that for all tryptamines **1** reaction easily passes at a boiling in ethanol and comes to the end during 10-15 h. Obviously, interaction begins with amino group tryptamines attack methylthio group of reagent, with elimination molecules of methyl mercaptan that gives intermediate 2-methyl-*N'*-cyano-*N*-[2-(1*H*-indol-3-yl)ethyl]imidothiocarbamate **2**. Further cyclizatione passes not at the expense of expected elimination the second molecule of methyl mercaptan and formations 2,3,4,9-tetrahydro-1H-β-carbolin-1-ylidenecyanamide **3a**, in summary joining of atom hydrogen at carbon atom being indole cycles to atom of nitrogen imido groups and short circuits carbon-carbon bond. Thus with the yield reaching 95 %, have been received 3[1(methylthio)-2,3,4,9-tetrahydro-1H-β-carbolin-1-yl]cyanamide **4**.



R = H, Me, MeO, F, Cl

Structure received compounds **4** is confirmed by data of ^{1}H NMR-spectroscopy and mass -spectrometry. Proceeding from structure of compounds **4**, it is possible to assume possibility elimination of second molecule of methyl mercaptan, at the expense of atom of hydrogen endo-cycles or exo-cycles amino groups that should lead 4,9-dihydro-3H-β-carbolin-1-ylcyanamide **3b** or it tautomer **3a**, accordingly. However it doesn't occur even in severe constraints.

For all received compounds virtual screening by means of program PASS developed in IBMKh the Russian Academy of Medical Science (Moscow http://www.msk.ru./PASS/) is carried out. Computer forecasting has foretold with the probability exceeding 80 % that these compounds will serotonin release stimulate, and also can find application as medical products at treatment of psychosexual dysfunction.

References:

1.*Dulenko etc.,* β-Karboliny. Khimija I nejrobiologija, - Kiev: Nayk. dumka, **1992,** 216 c.
2.*Brian E. Love,* Synthesis of Carbolines Possessing Antitumor Activity, *Top Heterocycl Chem*, **2006** *2* 93-128

ЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКОЕ ПРИСОЕДИНЕНИЕ БАРБИТУРОВЫХ КИСЛОТ К ИЗАТИНАМ: СИНТЕЗ 5,5'-(2-ОКСО-2,3-ДИГИДРО-1*H*-ИНДОЛ-3,3-ДИИЛ)БИС(ПИРИМИДИН-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-ТРИОНОВ)

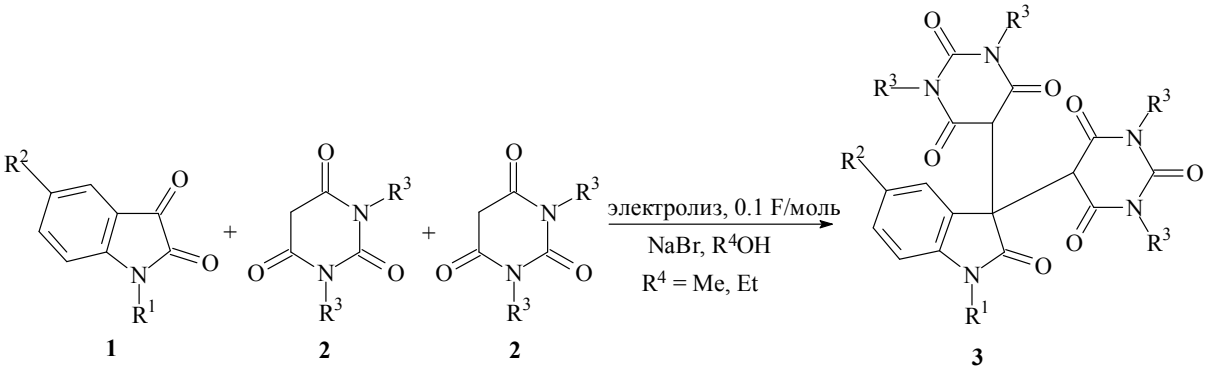
Меркулова В.М., Иловайский А.И., Элинсон М.Н., Никишин Г.И.

Учреждение Российской академии наук Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия
e-mail: ilov@ioc.ac.ru

Изатин (1*H*-индол-2,3-дион) и его производные достаточно широко применяются в медицинской химии [1]. С другой стороны, производные барбитуровой кислоты являются известным классом лекарственных средств широкого спектра действия на центральную нервную систему, от мягкого седативного эффекта до полной анестезии, и также эффективны в качестве снотворных и противоэпилептических средств [2].

Модификация биологически активных индольных фрагментов фармакологически активными фрагментами барбитуровых кислот представляет значительный интерес с точки зрения медицинской химии. Недавно была обнаружена противораковая активность у двух 5,5'-(2-оксо-2,3-дигидро-1*H*-индол-3,3-диил)бис(пиримидин-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-трионов) [3].

Мы установили, что электрохимически инициированная цепная трансформация изатинов **1** и барбитуровых кислот **2** в замещенные 5,5'-(2-оксо-2,3-дигидро-1*H*-индол-3,3-диил)бис(пиримидин-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-трионы) **3** эффективно протекает при их совместном электролизе в бездиафрагменном электролизере. В оптимальных условиях (этанол, 78 °C) электролиз изатинов **1** и барбитуровых кислот **2** приводит к замещенным 5,5'-(2-оксо-2,3-дигидро-1*H*-индол-3,3-диил)бис(пиримидин-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-трионам) **3** с выходом 89-95% и выходом по току 890-950% за 32 мин.



R^1 = H, Me, CH_2Ph, CH_2COOEt;
R^2 = H, Me, Cl, Br; R^3 = H, Me, Et

Роль электрического тока заключается в генерации на катоде каталитических количеств алкоголят-анионов, под действием которых образуется анион барбитуровой кислоты. Последующий процесс, протекающий в растворе, представляет собой типичную каскадную реакцию Кневенагеля-Михаэля. В отличие от ранее обнаруженного электрокаталитического цепного альдольного присоединения циклических 1,3-дикетонов к изатинам [4], данный электрохимически инициированный процесс не останавливается на стадии альдольного присоединения барбитуровых кислот **2** к изатинам **1**. В изученных условиях происходит быстрая дегидратация с образованием продукта конденсации Кневенагеля, и еще более быстрое присоединение второй молекулы барбитуровой кислоты **2** по Михаэлю. Даже при низкой конверсии исходных веществ в реакционной смеси, по данным ЯМР-спектроскопии, присутствует только продукт реакции Михаэля **3**.

Преимуществами разработанного нами метода синтеза перспективных с точки зрения медицинской химии бис(барбитуратов) оксиндола являются использование каталитического количества электричества, простота проведения процесса и его привлекательность с точки зрения «зеленой химии».

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 09-03-00003а).

Литература

1. *S.N. Pandeya, S. Smitha, M. Jyoti, S.K. Sridhar.* // *Acta Pharm.* 2005, **55**, 27-46.
2. *L.L. Brunton, J.S. Lazo, K.L. Parker* // Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Edition, The McGraw-Hill Companies, Inc., 2006.
3. *L.R. Morgan, B.S. Jursic, C.L. Hooper, D.M. Neumann, K. Thangaraj, B. LeBlanc.* // Bioorg. Med. Chem. Lett., 2002, **12**, 3407-3411.
4. *M.N. Elinson, V.M. Merkulova, A.I. Ilovaisky, A.O. Chizhov, P.A. Belyakov, F. Barba, B. Batanero.* // Electrochim. Acta, 2010, **55**, 2129-2133.

THE ELECTROCATALYTIC ADDITION OF BARBITURIC ACIDS TO ISATINS: FACILE AND EFFICIENT WAY TO 5,5'-(2-OXO-2,3-DIHYDRO-1*H*-INDOLE-3,3-DIYL)BIS(PYRIMIDINE-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-TRIONE) SCAFFOLD

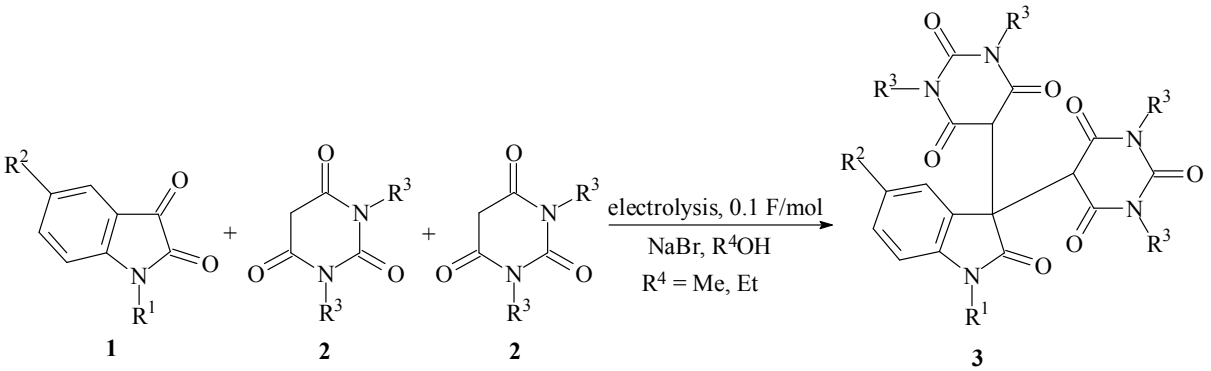
Merkulova V.M., Ilovaisky A.I., Elinson M.N., Nikishin G.I.

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Moscow, Russia
e-mail: ilov@ioc.ac.ru

Isatin (1*H*-indole-2,3-dione) and its derivatives have sufficient application in medicinal chemistry [1]. On the other hand, derivatives of barbituric acid are the class of drugs that act as central nervous system depressants, and by virtue of this they produce a wide spectrum of effects, from mild sedation to anesthesia, and are also effective as hypnotics and as anticonvulsants [2].

The modification of diverse biologically active indole scaffold with pharmacologically active barbiturates fragments should prove useful to find a different types of activity from a medicinal point of view. And really, anti-cancer activity recently have been found for 5,5'-(2-oxo-2,3-di-hydro-1H-indole-3,3-diyl)bis(1,3-dimethylpyrimidine-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-trione) framework [3].

In the present study we report our results on electrochemically induced chain transformation of isatins **1** and barbituric acids **2** into substituted 5,5'-(2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-3,3-diyl)bis(pyrimidine-2,4,6-(1*H*,3*H*,5*H*)-triones) **3** by the combined electrolysis. Under the optimal conditions (ethanol, 78 °C) the electrolysis of isatins **1** and barbituric acids **2** in an undivided cell affords in the corresponding 5,5'-(2-oxo-2,3-dihydro-1*H*-indole-3,3-diyl)dipyrimidine-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triones **3** in 89-95% yields (890-950% current yield) over 32 min.



R^1 = H, Me, CH_2Ph, CH_2COOEt;
R^2 = H, Me, Cl, Br; R^3 = H, Me, Et

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 barbituric acid **2** gives rise to the barbituric acid anion. The following process in the solution represents a typical base-promoted cascade Knoevenagel-Michael reaction. Compare to the earlier found electrocatalytic chain addition of cyclic 1,3-diketones to isatins [4], our new electrochemically induced process did not stopped at the stage of electrochemically induced aldol addition of barbituric acids **2** to isatins **1**. Under conditions studied rapid Knoevenagel reaction then takes place followed by more rapid Michael addition of the second molecule of barbituric acid **2**. Even under low conversion of starting compounds only Michael product **3** was detected in the reaction mixture by the NMR-data.

This efficient electrocatalytic method of the formation of medicinally relevant oxindole bis(barbiturates) utilizes only catalytic amount of electricity; it is easy to carry out and the process is beneficial from the viewpoint of “green” organic synthesis.

The authors gratefully acknowledge the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 09-03-00003a)

References

1. *S.N. Pandeya, S. Smitha, M. Jyoti, S.K. Sridhar.* // *Acta Pharm.* 2005, **55**, 27-46.
2. *L.L. Brunton, J.S. Lazo, K.L. Parker* // Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Edition, The McGraw-Hill Companies, Inc., 2006.
3. *L.R. Morgan, B.S. Jursic, C.L. Hooper, D.M. Neumann, K. Thangaraj, B. LeBlanc.* // Bioorg. Med. Chem. Lett., 2002, **12**, 3407-3411.
4. *M.N. Elinson, V.M. Merkulova, A.I. Ilovaisky, A.O. Chizhov, P.A. Belyakov, F. Barba, B. Batanero.* // Electrochim. Acta, 2010, **55**, 2129-2133.

ЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКИЙ МУЛЬТИКОМПОНЕНТНЫЙ СИНТЕЗ СПИРОЦИКЛИЧЕСКИХ АЦЕНАФТИЛЕН-1,4'-ПИРАНО[2,3-*c*]ПИРАЗОЛОВ

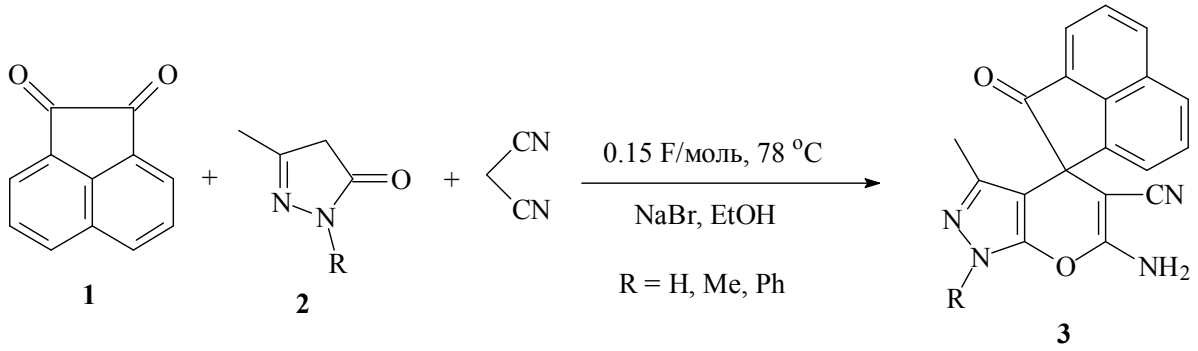
Меркулова В.М., Иловайский А.И., Элинсон М.Н., Никишин Г.И.

Учреждение Российской академии наук Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, Россия
e-mail: ilov@ioc.ac.ru

Функционально замещенные пирано[2,3-*c*]пиразолы являются привлекательными объектами в области медицинской химии, поскольку проявляют противораковую активность путем селективного ингибирования Chk 1 киназы [1], а также активны в отношении лекарственно устойчивых Т –лимфобластоидных линий CCRF-VCR 1000 [2] и проявляют антивирусную активность в отношении цитомегаловируса человека AD169 [3]. В свою очередь, спиро[аценафтилен-1,4'-пираны] являются эффективными антибактериальными и антигрибковыми агентами [4,5].

В настоящей работе предложен простой и удобный метод синтеза соединений, содержащих одновременно спиро[аценафтилен-1,4'-пирановый] и пирано[2,3-*c*]пиразольный фрагменты, что придает данным структурам дополнительный интерес с точки зрения медицинской химии.

Установлено, что электрохимически инициированная мультикомпонентная трансформация аценафтенхинона **1**, пиразолонов **2** и малононитрила в спиртах в бездиафрагменной ячейке в присутствии бромида натрия в качестве электролита приводит к спироциклическим аценафтилен-1,4'-пирано[2,3-*c*]пиразолам с выходом по веществу 86–90% и выходом по току 570-600%:



Роль электрического тока заключается в генерации на катоде каталитических количеств алкоголят-анионов, под действием которых образуется анион малонодинитрила. Последующий процесс, протекающий в растворе, представляет собой типичную каскадную реакцию Кневенагеля-Михаэля с последующей циклизацией. Полученные 6'-амино-3'-метил-2-оксо-1H,2'H-спиро[аценафтилен-1,4'-пирано[2,3-*c*]пиразол]-5'-карбонитрилы **3** 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

1. *N. Foloppe, L.M. Fisher, R. Howes, A. Potter, A.G.S. Robertson, A.E. Surgenor.* // Bioorg. Med. Chem., 2006, **14**, 4792–4802.
2. *D. Kaiser, L. Terfloth, S. Kopp, J. Schulz, R. de Laet, P. Chiba, G.F. Ecker, J. Gasteiger.* // J. Med. Chem., 2007, **50**, 1698–1702.
3. *D.M. Coen, A. Loregian* // Int. Appl. WO2006019955 (2006).
4. *A. Nandakumar, P. Thirumurugan, P.T. Perumal, P. Vembu, M.N. Ponnuswamy, P. Ramesh.*// Bioorg. Med. Chem. Lett., 2010, **20**, 4252–4258.
5. *S. Ahadi, Z. Yasaei, A. Bazgir.* // *J. Het. Chem.*, 2010, **47**, 1090-1094.

THE ELECTROCATALYTIC MULTICOMPONENT APPROACH TO SPIROCYCLIC ACENAPHTHYLENE-1,4'-PYRANO[2,3-*c*]PYRAZOLE SYSTEM

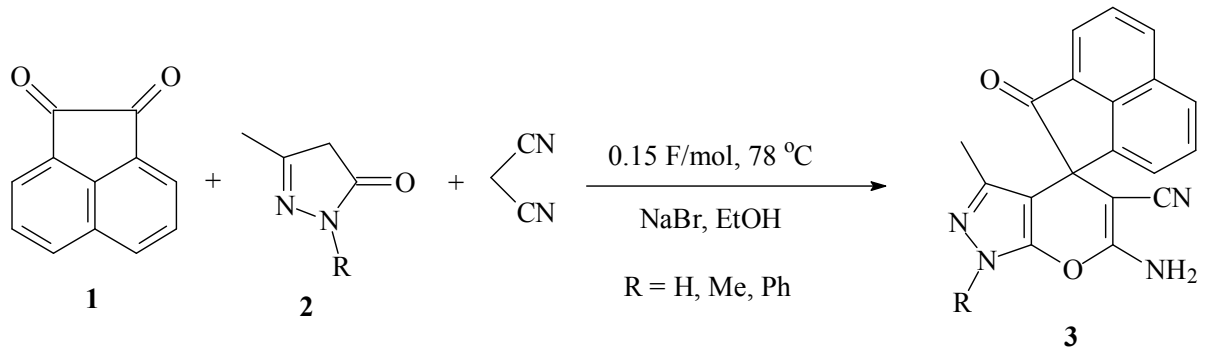
Merkulova V.M., Ilovaisky A.I., Elinson M.N., Nikishin G.I.

N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Moscow, Russia
e-mail: ilov@ioc.ac.ru

Functionally substituted pyrano[2,3-*c*]pyrazoles are of particular interest due to their anticancer activity through the selective inhibition of human Chk 1 kinase [1], and also activity on multidrug resistant human T lymphoblastoid cell line CCRF-VCR 1000 [2] and anti-viral activity on human cytomegalovirus AD169 [3]. Furthermore, spiro[acenaphthylene-1,4'-pyranes] appear to be effective antibacterial and antifungal agents [4,5]. The spiro system incorporating acenaphthylene-1,4'-pyrano- and pyrano[2,3-*c*]pyrazole fragments should prove useful from medicinal and biological points of view.

Novel electrochemically induced chain process offers an efficient and convenient way to create spirocyclic acenaphthylene system with fused cyano-functionalized pyrano[2,3-*c*]pyrazole fragment – the hybridized 'privileged drug scaffold' for different biomedical applications.

Electrochemically induced catalytic multicomponent transformation of acenaphthenequinone **1**, pyrazolones **2** and malononitrile in alcohols in an undivided cell in the presence of sodium bromide as an electrolyte results in the formation of 2-oxo-spiro[acenaphthylenes] with fused functionalized pyrano[2,3-*c*]pyrazole system in 86-90% yields and 570-600% 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, 6'-amino-3'-methyl-2-oxo-1H,2'H-spiro[acenaphthylene-1,4'-pyrano[2,3-*c*]pyrazole]-5'-carbonitriles **3** 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 acenaphthylene-1,4'-pyrano[2,3-*c*]pyrazoles 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

1. *N. Foloppe, L.M. Fisher, R. Howes, A. Potter, A.G.S. Robertson, A.E. Surgenor.* // Bioorg. Med. Chem., 2006, **14**, 4792–4802.
2. *D. Kaiser, L. Terfloth, S. Kopp, J. Schulz, R. de Laet, P. Chiba, G.F. Ecker, J. Gasteiger.* // J. Med. Chem., 2007, **50**, 1698–1702.
3. *D.M. Coen, A. Loregian* // Int. Appl. WO2006019955 (2006).
4. *A. Nandakumar, P. Thirumurugan, P.T. Perumal, P. Vembu, M.N. Ponnuswamy, P. Ramesh.*// Bioorg. Med. Chem. Lett., 2010, **20**, 4252–4258.
5. *S. Ahadi, Z. Yasaei, A. Bazgir.* // *J. Het. Chem.*, 2010, **47**, 1090-1094.

ТАУТОМЕРИЯ β-ДИ-, β,β′-ТРИКАРБОНИЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПОЛЯРНЫХ ИОНИЗУЮЩИХ СРЕДАХ

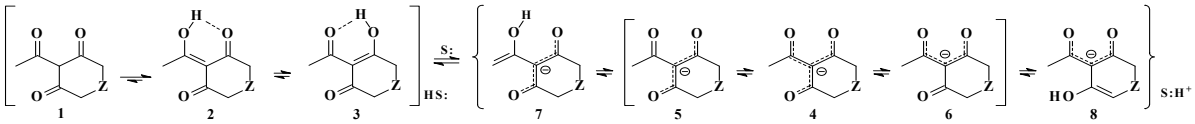
[1]Михальчук А.Л., [2]Курман П.В.

[1]ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», Минск, Беларусь. e-mail: lipmal@iboch.bas-net.by
[2]ГУ «НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Минск, Беларусь. e-mail: pharmcenter@it.org.by

β-Ди-, β,β′-трикарбонильные соединения (β-ди-, β,β′-триКС — дигидрорезорцины, β-кетоэфиры, триацилметаны, 2-ацилциклан-1,3-дионы и их гетероциклические аналоги) — многочисленная и разнообразная группа веществ, объединённых 1,3- или β-дикарбонильным структурным фрагментом и явлением прототропии или таутомерии [1, 2]. β-Ди-, β,β′-триКС широко представлены в природных объектах от микроорганизмов до высших растений и млекопитающих и выполняют важные биологические функции в процессах их жизнедеятельности [3]. Эти вещества являются важными реагентами лабораторного и многотоннажного органического синтеза [4]. Отличительной особенностью β-ди-, β,β′-триКС является их таутомерия.

Таутомерия – одно из наиболее всеобъемлющих качеств материи, определяющих ее структурное многообразие и двойственность свойств. Таутомерия играет важную роль в химии и биологии и дальнейшее развитие этих дисциплин с проникновением в глубинные причинно-следственные взаимосвязи химических и биологических явлений и процессов не может быть достигнуто без учета и понимания таутомерии. При этом даже для наиболее известных и давно изучаемых таутомерных превращений – прототропии и сегодня остается множество вопросов и неверных представлений.

Современные знания о таутомерии β-ди-, β,β′-триКС ограничиваются представлениями о *кето-енол — енол-енольных* или 1,3(C,O-O,C) — 1,5(O,O′-O′,O) протонных изомеризациях, которые в приложении к 2-ацилциклан-1,3-дионам описываются равновесиями (**1 - 3**) 2, 5, 6].



Равновесия (**1 – 3**) представляют в наиболее общем виде таутомерию ацилцикландионов в амфипротонных средах (HS: — спирты, вода, и др.) без учёта их строения, влияния окружающей среды и других физико-химических факторов [2, 5, 6]. Таутомерия β-ди-, β,β′-триКС в полярных ионизующих средах (S: — полярные апротонные растворители: ДМСО, ДМФА, ГМФТА, пиридин и др.) до последнего времени оставалась вне поля зрения исследователей и в научно-технической литературе не обсуждалась. Тем не менее, имеется множество данных, которые невозможно объяснить представлениями, суммированными равновесиями (**1 – 3**). Это, например, процессы биосинтеза ключевых низкомолекулярных биоэффекторов [7], реакции аннелирования шиффовых оснований β-ди-, β,β′-триКС [8], результаты H/D-, H/T-обмена β-ди-, β,β′-триКС [9] и другие.

H/D-обмен β-ди-, β,β′-триКС в полярных ионизующих средах свидетельствует, что прототропия β-ди-, β,β′-триКС не ограничивается *кето-енольной* (**1** ⇌ **2**) и *енол-енольной* (**2** ⇌ **3**) протонными изомеризациями, а распространяется на прилегающие к β-ди-, β,β′-трикарбонильным фрагментам метильные, метиленовые или метиновые группы приводя к соответствующим изотопным производным или изотопомерам [9]. Эти данные позволяют утверждать, что в полярных ионизующих средах генерируются изомеризующиеся мезомерные анионы β-ди-, β,β′-триКС (**5** ⇌ **4** ⇌ **6**), которые претерпевают равновесные *кето-енольные* изомеризации (**5** ⇌ **7**) и (**6** ⇌ **8**), соответственно. В дейтериевых средах изомерные *енол-анионы* (**7**) и (**8**) в соответствии с законом действующих масс дают соответствующие дейтеропроизводные по примыкающим к β-ди-, β,β′-трикарбонильным фрагментам метильным, метиленовым или метиновым группам и, таким образом, визуализируют таутомерию анионов β-ди-, β,β′-триКС и объясняют их реакционную способность [8, 9].

Представленные равновесия (**5** ⇌ **7**) ⇌ (**6** ⇌ **8**) позволяют объяснить наиболее скрытые, тонкие процессы, протекающие на молекулярном уровне β-ди-, β,β′-триКС, а также в переходных состояниях химических реакций с участием β-ди-, β,β′-триКС. В частности, это процессы биосинтеза жиров, липидов, простагландинов, терпенов, стероидов и других биоэффекторов.

Литература:

1. *Rubinov D.B., Rubinova I.L., Akhrem A.A.* - Chem. Reviews, 1999, т. 99, №4, с. 1047-1065.
2. Строение и таутомерные превращения β–дикарбонильных соединений. Под ред. Э.Ю. Гудриниеце. Рига: Зинатне, 1977, 448 с.
3. *Рубинов Д.Б., Рубинова И.Л., Ахрем А.А.* - Хим. прир. соед., 1995, №5, с. 635-663.
4. Acetoacetates, Basle: Lonza Ltd., 1987, 77 p.
5. *Кабачник М.И.* - ЖВХО им. Д.И. Менделеева, 1962, т. 7, №3, с. 263-276.
6. Минкин В.И., Олехнович Л.П., Жданов Ю.А. - Молекулярный дизайн таутомерных систем, Ростов-на-Дону: Ростовский ун-т, 1977, 271 с.
7. *Staunton J., Weissman K.J.* - Nat. Prod. Rep., 2001, v. 18, p. 380–416.
8. *Ахрем А.А., Гулякевич О.В., Михальчук А.Л.* - в кн. Азотистые гетероциклы и алкалоиды, под ред. В.Г. Карцева, Г.А. Толстикова, М.: Иридиум-Пресс, 2001, т. 1, с. 31-45.
9. Патент РБ №5803 (C 07C 49/403, 49/395, 49/753, C 07B 59/00 // C 07M 5:00) / Михальчук А.Л., Гулякевич О.В. - Афіцыйны бюллетень. Вынаходніствы, карыстныя мадэлі, прамысловыя ўзоры, 2003, №4(39), с. 145.

TAUTOMERISM OF β-DI-, β,β′-TRICARBONYL COMPOUNDS IN IONIZING DIPOLAR MEDIUM

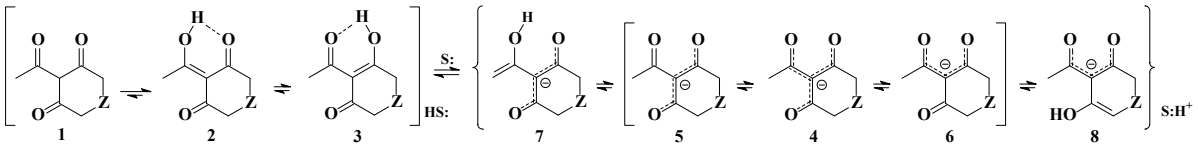
[1]Mikhal'chuk A.L., [2]Kurman P.V.

[1]PSI «Institute of bioorganic chemistry NAS of Belarus», e-mail: lipmal@iboch.bas-net.by
[2]PI «SPC «Institute of pharmacology and biochemistry NAS of Belarus»», e-mail: pharmcenter@it.org.by

β-Di-, β,β'-tricarbonyl compounds (β-di-, β,β'-TriCC — dihydroresorcines, β-ketoesters, triacylmethanes, 2-acylcyclan-1,3-diones and their heterocyclic analogues) — are large and diverse group of substances, united by 1,3- or β-dicarbonyl fragment and by the phenomenon of prototropii or tautomerism [1, 2]. β-Di-, β,β'-TriCC are widely represented in natural objects from microorganisms to higher plants and mammals, and carry out important biological functions during their vital functions [3]. These substances are important reagents for laboratory and tonnage organic synthesis [4]. The tautomerism of β-di-, β,β′-triCC is their distinctive feature.

The tautomerism is one of the most universal qualities of a matter defining its structural variety and a duality of properties.Tautomerism plays the important role in chemistry and biology, and the further development of these disciplines with penetration into the deep causes and effect interrelations of the chemical and biological phenomena and processes cannot be achieved without taking tautomerism into account. However, there are many questions and erroneous concepts even for the most known and for a long time researched tautomeric transformations (prototropy).

Current knowledge about the tautomerism β-di-, β,β'-triCC limited notions of *keto-enol* - *enol-enol* and 1,3 (C,O – O,C) 1,5 (O,O'-O',O) proton isomerization, which is annexed to 2-atsiltsiklan-1 ,3-dione described by equilibria (1 - 3) [2, 5, 6].



The equilibrium (**1 - 3**) describe the most common form of tautomerism acylcyclandiones in amphiprotic media (HS: — alcohols, water, etc.) without regard to their structure, environmental impact and other physical and chemical factors [2, 5, 6]. Tautomerism of β-di - β,β'-triCC in polar ionizing medium (S: - polar aprotic solvents: DMSO, DMF, GMFTA, pyridine, etc.) until recently remained out of sight of researchers and in the scientific and technical literature was not discussed.Nevertheless, there are plenty of data that is impossible to explain concepts, summarized by the equilibria (**1 - 3**). This, for instance, the biosynthesis of key low-molecular bio-effectors [7], the annelation of Schiff bases by β-di-, β, β'-triCC reactions [8], the results of the β-di-, β,β'-triCC H/D-, H/T-exchange [9] and others.

The H/D-exchange of β-di-, β, β'-triCC in polar ionizing media indicate that the prototropy of β-di-, β, β'-triCC is not limited to the *keto-enol* (**1** ⇌ **2**) and *enol-enol* (**2** ⇌ **3**) proton isomerization, and extends to adjacent to β-di-, β,β'-tricarbonyl fragments methyl, methylene or methine group leads to the corresponding isotopic derivatives. These data allow to confirm that in the polar ionizing media generated isomerizing mesomeric anions of β-di-, β,β'-triCC (**5** ⇌ **4** ⇌ **6**), which undergo equilibrium *keto-enol* isomerizations (**5** ⇌ **7**) and (**6** ⇌ **8**), respectively. In the deuterium media isomeric *enol-anions* (**7**) and (**8**) according to law of mass action give the corresponding deuterium derivatives of methyl, methylene or methine groups adjacent to the β-di-, β,β'-tricarbonyl fragments and, thus, visualize a tautomerism of β-di - β,β'-triCC anions and explain their reactive capacity [8, 9].

Presented equilibriums (**5** ⇌ **7**) ⇌ (**6** ⇌ **8**) allow to explain the most latent, delicate processes carry out at molecular level of β-di - β,β′-triCC, and also in the transient states of chemical reactions with participation of β-di - β, β′-трИКС. In particular these are the processes of biosynthesis lipids, prostaglandins, terpenes, steroids, and others bio-effectors.

References:

1. *Rubinov D.B., Rubinova I.L., Akhrem A.A.* - Chem. Reviews, 1999, т. 99, №4, с. 1047-1065.
2. Structure and tautomeric transformation of the β-dicarbonyl compounds. Ed. by. E.Yu. Gudriniece - Riga: Zinatne, 1977, 448 p. (in Russian).
3. *Rubinov D.B., Rubinova I.L., Akhrem A.A.* - Khim. Prirodn. Soedin., 1995, №5, с. 635-663.
4. Acetoacetates, Basle: Lonza Ltd., 1987, 77 p.
5. *Kabachnik M.I.* - ZhVChO name D.I. Mendeleev, 1962, v. 7, №3, p. 263-276.
6. *Minkin V.I., Olekhnovich L.P., Zhdanov Yu.A.* - Molekulyarnyi dizain tautomernikh sistem, Rostov-on-Don: Rostov University Press, 1977, 271 p. (in Russian).
7. *Staunton J., Weissman K.J.* - Nat. Prod. Rep., 2001, v. 18, p. 380–416.
8. *Akhrem A.A., Gulyakevich O.V., Mikhal'chuk A.L.* – in book. Азотистые гетероциклы и алкалоиды, под ред. V.G. Kartsev, G.A. Tolstikov, Moscow: Iridium Press, 2001, v. 1, p. 19-32.
9. Pat. BY №5803 (C 07C 49/403, 49/395, 49/753, C 07B 59/00 // C 07M 5:00) / Mikhal'chuk A.L., Gulyakevich O.V. - The official bulletin. The inventions, useful model, commercial standards, 2003, №4(39), p. 145.

6-R-7-ГИДРОКСИ-8-[(ДИЭТИЛАМИНО)МЕТИЛ]-4-ФЕНИЛ-2*H*-ХРОМЕН-2-ОН В РЕАКЦИЯХ *O*- И *N*-АЛКИЛИРОВАНИЯ

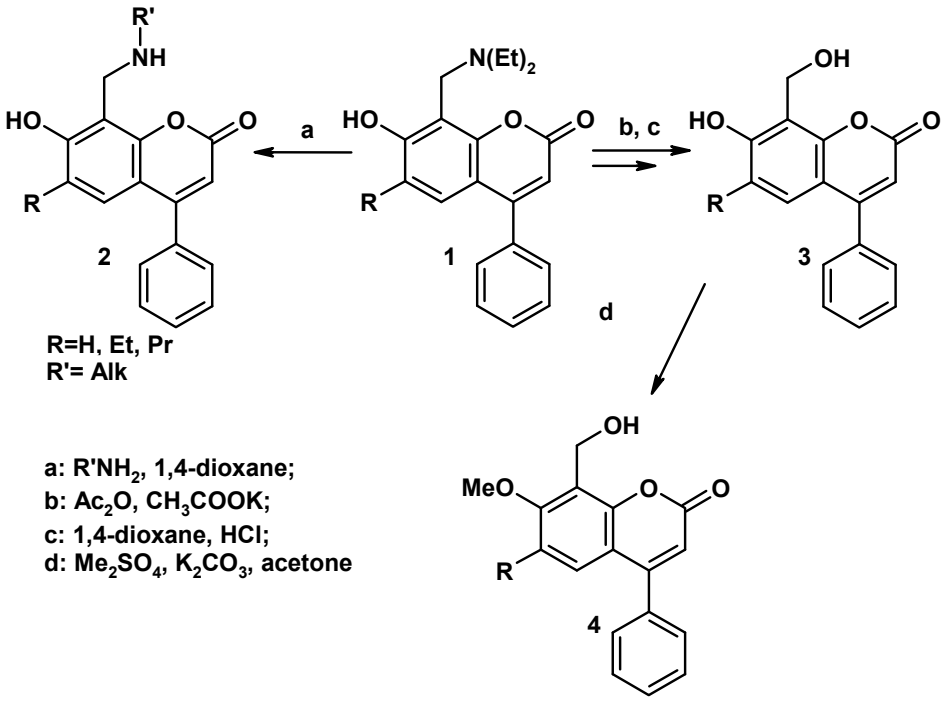
Москвина В.С., Глебов Е.К., Хиля В.П.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина
e-mail: v.moskvina@gmail.com

Производные неофлавонов – 4-фенил-2*H*-хромен-2-онов – широко распространены в природе и имеют разноплановый спектр биологических свойств. Исследования последних лет подтверждают перспективность соединений данного класса в медицинской химии.

С другой стороны, повышенный интерес к химии оснований Манниха вызван несколькими факторами. Во-первых, реакция Манниха вводит в молекулу основную группу, что приводит к повышению растворимости в водных растворителях при превращении на амонийную соль. Во-вторых, основания Манниха являются легкодоступными интермедиатами для синтеза других классов соединений – спиртов, аминоспиртов, эфиров и т.д. И, наконец, основания Манниха были изучены как потенциальные биологические агенты, как красители, поверхностно активные вещества.

Нами получен ряд 7-гидроксидиэтиламинометильных производных неофлавонов (**1**) по реакции Манниха, используя бисдиэтиламинометан в качестве аминометильной компоненты. Взаимодействие соединений **1** с первичными аминами привело к получению соединений типа **2**. Следует заметить, что синтезированные таким образом соединения **2** тяжело получить, используя другие синтетические методологии. Замещение диэтиламиногруппы на гидроксильный остаток с получением спиртов **3** нами осуществлено при последовательном ацетилировании и гидролизе соединений типа **1**. Алкилирование соединений **3** в условиях реакции Вильямсона проходило с образованием 7-метокси-8-гидроксиметилнеофлавонов **4**.



Структура новых продуктов содержит не только фармакофорные группы, но и даёт достаточно возможностей для дальнейших синтетических превращений.

6-R-8-[(DIETHYLAMINO)METHYL]-7-HYDROXY-4-PHENYL-2*H*-CHROMENE-2-ONE IN *O*- AND *N*-ALKYLATION REACTIONS

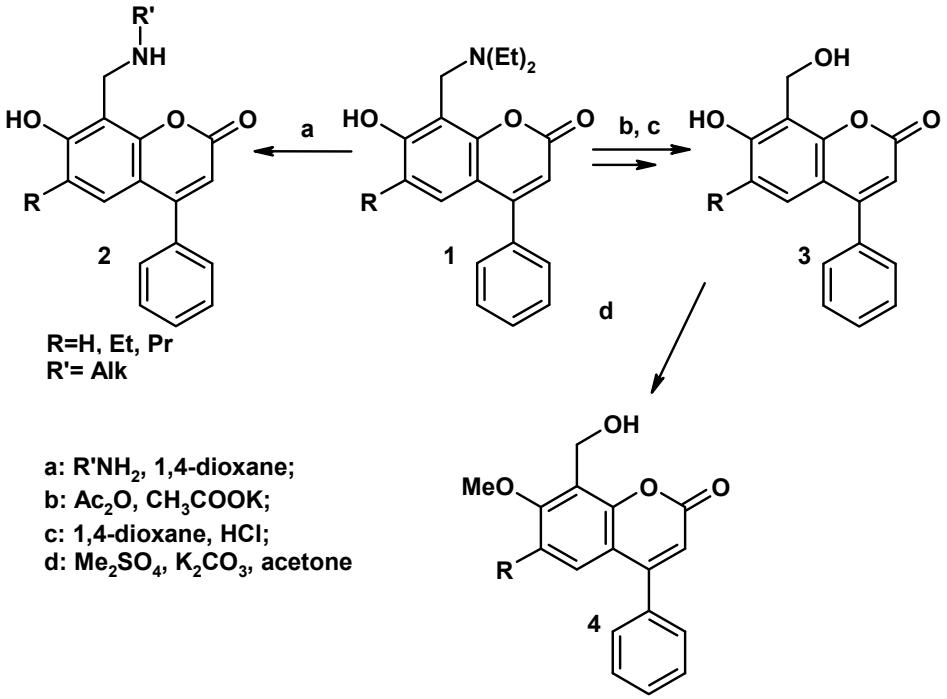
Moskvina V.S., Glebov E.K., Khilya V.P.

Taras Shevchenko National University of Kiev, Kiev, Ukraine
e-mail: v.moskvina@gmail.com

Derivatives of neoflavones (4-phenyl-2H-chromene-2-ones) widely occur in nature and possess a diverse range of biological properties. Recent research confirms promising prospects for these compounds in medical chemistry.

From the other side, chemistry of Mannich bases attracts keen interest due to several reasons. First, Mannich reaction introduces a basic group into a molecule, increasing the compound's solubility in aqueous solvents when converted to an ammonium salt. Second, Mannich bases are easily accessible intermediates for the synthesis of compounds of other classes, such as alcohols, aminoalcohols, ethers, etc. Finally, Mannich bases have been studied as potential biological agents, dyes, surfactants.

We have obtained a group of 7-hydroxydiethylaminomethyl derivatives of neoflavones (**1**) via the Mannich reaction. Bisdiethylaminomethane was used as an aminomethyl component. Interaction of coumpounds **1** with primary amines led to compounds of type **2**. It is worthwhile noticing that compounds **2** thus obtained are not as readily obtained via different synthetic approaches. Diethylamino group substitution with hydroxyl led to alcohols **3** and was performed through acetylation of **1** with subsequent hydrolysis. Alkylation of compounds **3** in Williamson reaction conditions resulted in 7-methoxy-8-hydroxymethyl-neoflavones **4**.



The new products' structure not only contains pharmacophore groups, but also provides an array of possibilities for further synthetic transformations.

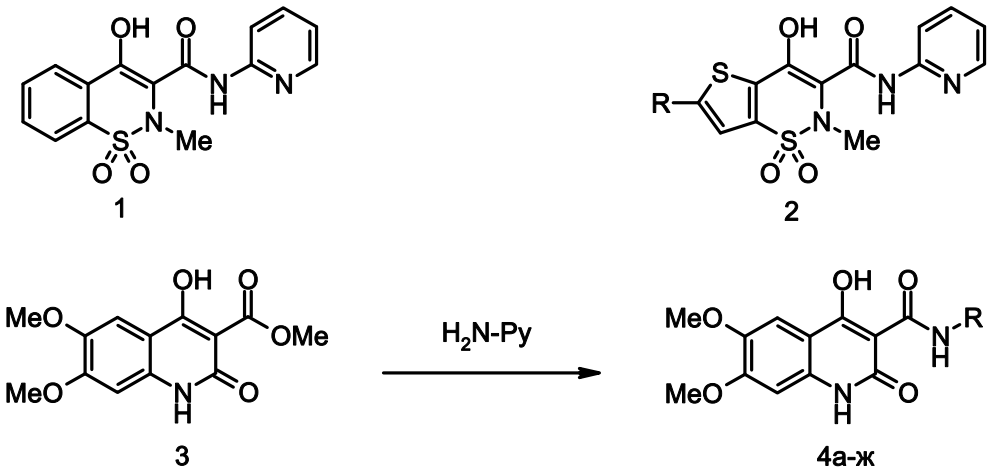
СИНТЕЗ И АНАЛЬГЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПИРИДИЛАМИДОВ 4-ГИДРОКСИ-6,7-ДИМЕТОКСИ-2-ОКСО-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИН-3-КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ

[1] Моспанова Е.В., [2]Украинец И.В., [2]Бевз О.В., [3]Савченкова Л.В., [3]Янкович С.И.

[1]Институт химических технологий Восточноукраинского национального университета им. Владимира Даля, Рубежное, Украина. e-mail: elena_mospanova@list.ru
[2]Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина
[3]Луганский государственный медицинский университет, Луганск, Украина

Среди современных обезболивающих препаратов важное место занимают нестероидные противовоспалительные средства. Яркими представителями данной фармакологической группы являются оксикамы [1]. Первым коммерческим препаратом этого ряда стал пиридин-2-иламид 4-гидрокси-2-метил-1,1-диоксо-2Н-1,2-бензотиазин-3-карбоновой кислоты (**1**), хорошо известный в нашей стране как пироксикам. Позже на фармацевтическом рынке появились новые препараты – теноксикам (**2**, R = H), изоксикам, мелоксикам, лорноксикам (**2**, R = Cl) – более активные, с улучшенными фармакокинетическими свойствами и получившие общее название селективных ингибиторов циклоксигеназы-2.

Обращает на себя внимание тот факт, что три препарата оксикамового ряда с выраженными анальгетическими свойствами являются пиридин-2-иламидами. С другой стороны, способность эффективно снимать боль была обнаружена нами у алкиламидов 1-аллил-4-гидрокси-6,7-диметокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновой кислоты [2]. Структурное сходство 4-гидроксихинолинового фрагмента этих соединений с бензотиазиновой (**1**) или тиенотиазиновой (**2**) основой оксикамовых анальгетиков настолько очевидно, что послужило теоретическим обоснованием для изучения биологических свойств пиридиламидов 4-гидрокси-6,7-диметокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновой кислоты (**4**), полученных амидированием метилового эфира **3** соответствующими аминопиридинами.



4: **а** R = пиридин-4-ил; **б** R = пиридин-3-ил; **в** R = пиридин-2-ил; **г** R = 3-метилпиридин-2-ил; **д** R = 4-метилпиридин-2-ил; **е** R = 5-метипиридин-2-ил; **ж** R = 6-метилпиридин-2-ил

Анальгетическую активность пиридиламидов **4а-ж** изучали на белых мышах, используя классическую модель "уксуснокислых корчей". Исследуемые вещества вводили перорально в дозе 20 мг/кг. В качестве препарата сравнения использован пироксикам в дозе 92 мг/кг ($ЭД_{50}$ этого препарата на данной модели). Полученные экспериментальные данные подтвердили наши предположения о целесообразности изучения амидов **4** – все они проявили обезболивающий эффект.

Установлено, что в ряду изомерных незамещенных пиридиламидов **4а-в** прослеживается четкая зависимость анальгетических свойств от положения атома азота в пиридиновом фрагменте: 3 < 4 < 2. В другой группе изомеров – 2-N-ацил-пиколинов **4г-ж** – наблюдаются несколько иные структурно-биологические закономерности: С-метилирование пиридинового ядра хоть и усиливает обезболивающее действие, но в целом эффект оказался незначительным и, к тому же, малочувствительным к положению метильной группы.

Литература:

1. *Vidal A., Chezal J.M., Mounetou E.* New quaternary ammonium oxicam derivatives: synthesis and in vitro antiosteo-arthritis evaluation. Eur. J. Med. Chem., 2010, Vol. 45, N1, p. 405-410.
2. *Ukrainets I.V., Mospanova E.V., Davidenko A.A., Shishkina S.V.* Synthesis, chemical reactions, and analgesic activity of 1-allyl-4-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acid alkylamides. Chem. Heterocycl. Comp., 2010, Vol. 46. N 9, p. 1084-1095.

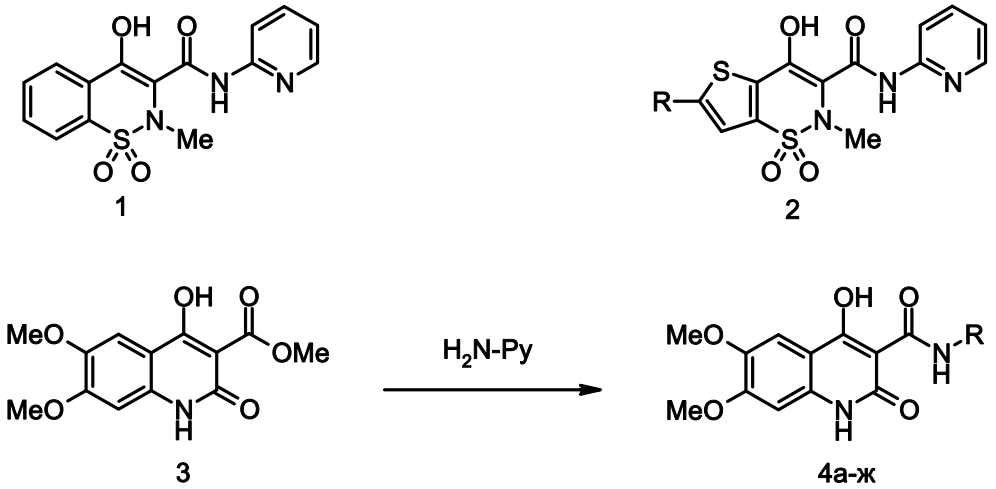
SYNTHESIS AND ANALGESIC PROPERTIES OF 4-HYDROXY-6,7-DIMETHOXY-2-OXO-1,2-DIHYDROQUINOLINE-3-CARBOXYLIC ACID PYRIDYLAMIDES

[1] Mospanova E.V., [2]Ukrainets I.V., [2]Bevz O.V., [3]Savchenkova L.V., [3]Yankovich S.I.

[1]Chemical Technologies Institute of the Vladimir Dal' Eastern-Ukrainian National University, Rubizhne, Ukraine. e-mail: elena_mospanova@list.ru
[2]National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine
[3]Lugansk State Medical University, Lugansk, Ukraine

Among state-of-the art analgesics, an important part is played by non-steroidal anti-inflammatory drugs. Typical representatives of this pharmacological group are oxicams [1]. It is pyridine-2-ylamide of 4-hydroxy-2-methyl-1,1-dioxo-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylic acid (**1**), also known in our country under the name of Piroxicam that became the first commercial drug of this series. Later on, some other new drugs appeared in the pharmaceutical market such as Tenoxicam (**2**, R = H), Isoxicam, Meloxicam, Lornoxicam (**2**, R = Cl) that were more active, with improved pharmacokinetic properties which became known under the common name of *selective cyclogenase-2 inhibitors.*

Attention must be drawn to the fact that three drugs of the oxicam series having pronounced analgesic properties are pyridine-2-ylamides. On the other hand, we have found the ability to effectively suppress pain in alkylamides of 1-allyl-4-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acid [2]. The structural similarity of the 4-hydroxyquinoline fragment of these compounds with benzothiazine (**1**) or thienothiazine (**2**) base of the oxicam analgesics is so strikingly obvious that it went to serve as a theoretical foundation for a study of the biological properties of 4-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acid pyridylamides (**4**) obtained by amidation of methyl ester **3** with corresponding aminopyridines.



4: **a** R = pyridine-4-yl; **b** R = pyridine-3-yl; **c** R = pyridine-2-yl; **d** R = 3-methylpyridine-2-yl; **e** R = 4-methylpyridine-2-yl; **f** R = 5-methylpyridine-2-yl; **g** R = 6-methylpyridine-2-yl

Analgesic effect of pyridylamides **4a-g** on white mice was studied using the classical method of acetic acid-induced writhings. The substances under examination were administered *per os* in a dose of 20 mg/kg. As a reference drug, Piroxicam was used in a dose of 92 mg/kg (equivalent to ED_{50} for this drug in this test).

The experimental data obtained confirmed our assumptions about the advisability of studying amides **4** as all of them showed an analgesic effect. It has been established that, in the series of isomeric unsubstituted pyridinylamides **4a-c,** there is a clear dependence of the analgesic properties on the nitrogen atom position in the pyridine fragment: 3 < 4 < 2. In another group of isomers – 2-N-acylpicolines **4d-g** – slightly different structural and biological behaviour was observed. As for C-methylation of the pyridine ring, although it can enhance analgesic action, its overall impact proved to be insignificant and, moreover, insensitive to the position of the methyl group.

References:

1. *Vidal A., Chezal J.M., Mounetou E.* New quaternary ammonium oxicam derivatives: synthesis and in vitro antiosteo-arthritis evaluation. Eur. J. Med. Chem., 2010, Vol. 45, N1, p. 405-410.
2. *Ukrainets I.V., Mospanova E.V., Davidenko A.A., Shishkina S.V.* Synthesis, chemical reactions, and analgesic activity of 1-allyl-4-hydroxy-6,7-dimethoxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acid alkylamides. Chem. Heterocycl. Comp., 2010, Vol. 46. N 9, p. 1084-1095.

РОЗРОБКА ІНГІБІТОРІВ НЕРЕЦЕПТОРНОЇ ТИРОЗИНКІНАЗИ ACK-1, НОВИХ АГЕНТІВ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАКУ ПРОСТАТИ

Муг Г.П., Белюга О.Г., Бондаренко С.П., Шибирин О.В., Фрасинюк М.С., Федоряк О.Д.

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ, Україна
e-mail: fedoryak_l@bpci.kiev.ua

Більшість ліків, які широко використовуються в онкології, неспецифічно діють на фундаментальні клітинні процеси метаболізму ДНК та клітинного поділу, що ускладнює результат лікування. Проте, останнім часом набуває значення пошук раціонально спрямованих агентів, що направлені на певні онкогенні сигнальні процеси, які відсутні або дуже слабко виражені в нормальних клітинах. Це дає можливість для створення селективних протипухлинних препаратів, серед яких низькомолекулярні інгібітори кіназ є найбільш перспективними.

Протеїнкінази відіграють важливу роль в багатьох сигнальних шляхах, включаючи здійснення контролю за ростом клітин, їх діленням та міграцією, багато з них приймають участь у туморогенезі. Деякі інгібітори кіназ вже розроблені та використовуються у протипухлинній терапії. Це такі відомі препарати як Глівек, що використовується для лікування хронічного мієлолейкозу (інгібітор c-Abl кінази), Тикерб - для лікування раку молочної залози (інгібітор HER2 кінази), Іресса - для лікування раку легенів (інгібітор рецептора ендотельного фактору росту) та інші.

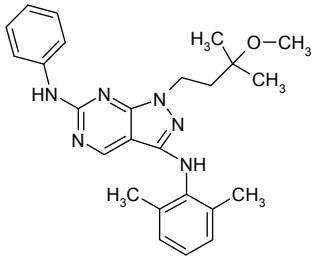
В рамках пошуку селективних лікувальних засобів при онкологічних захворюваннях ми зупинили свій вибір на нерецепторній тирозинкіназі Ack-1 (activated Cdc42-associated kinase), яка відіграє значну роль в розвитку гормонально-резистентної форми раку простати, позитивно регулюючи андрогенний рецептор в середовищі з низьким вмістом андрогену. Розвиток цього захворювання викликає миттєве погіршення стану хворих, яке не може бути покращено жодним з загальноприйнятих методів лікування (гормональна, променева та хіміо-терапія). Згідно останнім даним Ack-1 задіяна також в процесі утворення метастаз в пухлинах багатьох типів. Отже, розробка селективного Ack-1 інгібітора може відкрити нові можливості лікування раку простати та можливо інших типів онкологічних захворювань. Інгібування досліджуваної кінази дозволить також дослідити її роль в прогресуванні злоякісних новоутворень.

На даний момент відомі лише два класи низькомолекулярних інгібіторів тирозинкінази Ack-1. Це похідні піразоло[3,4-*d*]піримідинів (IC_{50} ≈ 0,02 μM) та фуро[2,3-*d*]піримідинів (IC_{50} ≈ 0,025 μM) (сполуки **1** та **2**).

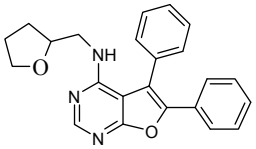
В роботі над створенням селективного інгібітора кінази Ack-1 об'єктами досліджень було вибрано феназинові та флавоноїдні похідні. Ці класи сполук, більшість з яких має природне походження, відомі своїми антибактеріальними, противірусними та протипухлинними властивостями.

З метою одержання селективного інгібітора Ack-1 був проведений детальний аналіз феназинових структур, та на основі віртуального скринінгу було відібрано декілька сполук для проведення тестування. Результати показали, що наявність ароматичного замісника в 5-му положенні феназину призводить до появи інгібуючої активності (сполука **3**). З метою покращення показників IC_{50} за допомогою комп'ютерного моделювання розроблено структури відповідних феназинових похідних, що можуть бути потенційними інгібіторами Ack-1.

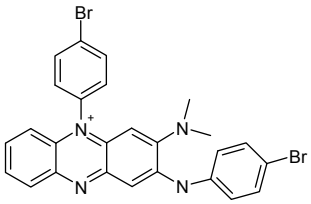
При вивченні результатів докінгу флавоноїдних структур виявилось, що вони розташовуються зовсім по-іншому в каталітичному центрі кінази ніж вже відомі інгібітори. Досліджено можливі механізми зв'язування з ферментом та відібрано структури для синтезу.



1



2



3

DEVELOPMENT OF NON-RECEPTOR TYROSINE KINASE (ACK-1) INHIBITORS, NEW AGENTS FOR TREATMENT OF PROSTATE CANCER

Mrug G.P., Beluga O.G., Bondarenko S.P., Shybyryn O.V., Frasynuk M.S., Fedoryak O.D.

Institut of bioorganic chemistry and petrochemistry National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: fedoryak_l@bpci.kiev.ua

Most of the commonly used anti-cancer drugs nonspecifically target fundamental cellular processes of DNA metabolism and cell division, complicating the treatment results. However, the emerging use of "rationally targeted" agents which impact on specific oncogenic signaling processes that are not present or weakly expressed in normal tissues, has provided an opportunity to create very selective anti-tumor drugs. Small-molecule kinase inhibitors are the most promising class for targeted therapy.

Protein kinases have been found to impact on many signaling pathways including cell proliferation, survival and migration, additionally many of them play crucial role in tumorigenesis. A number of kinase inhibitors have therefore already been developed and approved for cancer treatment. These include Gleevec which is used for treatment of chronic myelogenous leukemia (c-Abl inhibitor), Tykerb - for treatment of breast cancer (HER2 inhibitor), Iressa - for treatment of lung cancer (endothelial growth factor receptor inhibitor), etc.

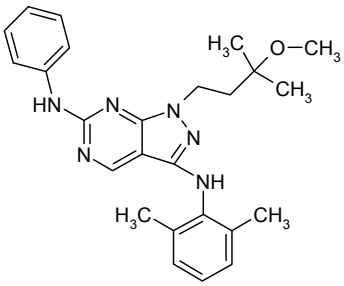
Our work targets a non-receptor tyrosine kinase Ack-1 (activated Cdc42-associated kinase) which plays an important role in the development of hormone-refractory prostate cancer by positively regulating AR in a low-androgen environment. Advanced form of this disease causes worsening of the patient's condition which can not be improved by any of generally accepted treatment methods (hormonal, radiation and chemotherapy). Additionally, it was shown that Ack-1 amplification and overexpression have occurred in many tumor types (including prostate) potentially predisposing them to become metastatic.

Taken together, these recent data suggest that the development of a selective Ack-1 inhibitor could be a potential new way for treating prostate cancer and possibly other different types of metastatic tumors. Additionally inhibition of Ack-1 would allow the role of this kinase in tumor progression to be probed.

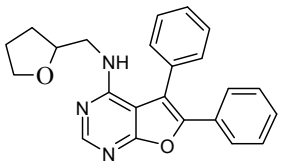
At this moment only two classes of small molecule tyrosine kinase inhibitors are known. These are derivatives of pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidines (IC_{50} ≈ 0,02 μM) and furo[2,3-*d*]pyrimidines (IC_{50} ≈ 0,025 μM) (compounds **1** та **2**).

During the course of our Ack-1 inhibitor program, we studied phenazine and flavonoid derivatives. These naturally occurring compounds are known to show antibacterial, antiviral and antitumor properties. We analyzed different phenazine structures by virtual screening and chose some of the compounds for biology testing. It was found that the presence of benzyl ring in the 5-position of phenazine resulted in the appearance of inhibition activity (compound **3**). Lead optimization was guided by computer modeling and led to the identification of some phenazine structures which can be potential Ack-1 inhibitors.

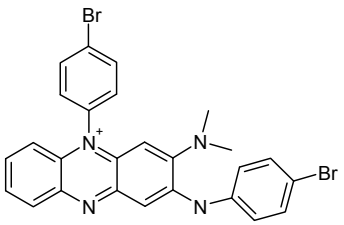
The docking study revealed that flavonoids bind to the Ack-1 catalytic kinase domain by completely different way than known inhibitors. The possible mechanisms of interaction were studied and the most promising candidates were selected for synthesis.



1



2



3

СИНТЕЗ И АНТИЭСТЕРАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ФТОРСОДЕРЖАЩИХ КАРБАМАТОВ

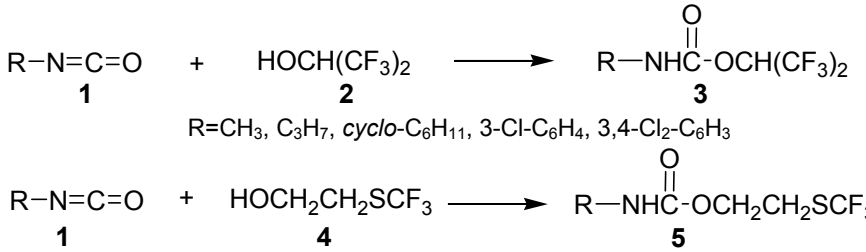
Мухамадиева Г.Р., Болтнева Н.П., Соколов В.Б., Махаева Г.Ф.

Институт физиологически активных веществ Российской Академии наук, Черноголовка, Россия
e-mail: mukhamadieva@ipac.ac.ru

Атом фтора имеют уникальную комбинацию физических свойств по сравнению с другими галогенами: наибольшую электроотрицательность и наименьший размер. Введение атомов фтора в молекулу оказывает влияние на ее физические и химические свойства, существенно изменяя ее биологическую активность. Сильное электронно-акцепторное влияние CF_3 группы изменяет pKa соседних функциональных групп данного соединения, в частности, повышает кислотный характер фторированных спиртов.

Наши предыдущие исследования антиэстеразной активности О-фосфорилированных гексафторизопропанолов показали перспективность использования гексафторизопропоксильного фрагмента в качестве уходящей группы, а также была установлена высокая селективность соединений в отношении карбоксилэстеразы. [1-2]

Целью данного исследования являлся синтез ранее неизвестных *О*-карбамоилированных 1-гидрогексафторизопропанолов **3** и *О*-карбамоилированных 2-трифторметилтиоэтанолов **5**, и изучение их ингибиторной активности в отношении трех сериновых эстераз: ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека (АХЭ, КФ 3.1.1.7), бутирилхолинэстеразы сыворотки лошади (БХЭ, КФ 3.1.1.8) и карбоксилэстеразы печени свиньи (КЭ, КФ 3.1.1.1). Карбаматы **3** и **5** были получены с количественным выходом взаимодействием изоцианатов **1** с 1-гидрогексафторизопропанолом **2** или 2-трифторметилтиоэтанолом **4** при 20°С в бензоле:



Ингибиторную активность характеризовали величиной IC_{50}. Исследуемые карбаматы растворяли в ДМСО. Образец фермента инкубировали с исследуемым соединением в концентрации от $1x10^{-12}$ до $1x10^{-3}$ М в течение 8 минут при 25°С (фосфатный буфер, 2% об. ДМСО), затем спектрофотометрически определяли остаточную активность фермента с использованием соответствующих субстратов.

Кинетические исследования показали, что полученные *О*-карбамоилированные 1-гидрогексафторизопропанолы **3** не ингибируют АХЭ, слабо ингибируют БХЭ и проявляют селективную ингибиторную активность в отношении КЭ, степень которой определяется структурой R: величины IC_{50} изменялись в интервале от $1x10^{-3}$ до $5.23x10^{-7}$ М.

О-карбамоилированные 2-трифторметилтиоэтанолы **5** также не ингибируют АХЭ, слабо ингибируют БХЭ (IC_{50} = $7.26x10^{-4}$ М для R=C_3H_7 и $1.11x10^{-3}$ М для R=*cyclo*-C_6H_{11}) и более эффективно – КЭ (IC_{50}= $9.44x10^{-5}$ М для R=C_3H_7 и $5.63x10^{-5}$ М для R=*cyclo*-C_6H_{11}).

Таким образом, молекулярный дизайн уходящей группы карбаматов трифторметильными фрагментами позволяет получить эффективные и селективные ингибиторы КЭ, которые могут найти применение в качестве модуляторов лекарственных и инсектицидных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы РАН ОХНМ 9 «Биомолекулярная и медицинская химия» и гранта РФФИ (проект №11-03-00581-а).

Литература:

1. *Г.Ф. Махаева, О.Г. Серебрякова, Н.П. Болтнева, Т.Г. Галенко, А.Ю. Аксиненко, В.Б. Соколов, И.В., Мартынов.* // Эстеразный профиль и анализ связи структура-ингибиторная селективность гомологичных фосфорилированных 1-гидроперфторизопропанолов - ДАН, 2008, т. 423, N6, с.826-831.
2. *G.F. Makhaeva, A.Y. Aksinenko, V.B. Sokolov, O.G. Serebryakova, R.J. Richardson.* // Synthesis of organophosphates with fluorine-containing leaving groups as serine esterase inhibitors with potential for Alzheimer disease therapeutics - Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009, v.19, p. 5528-5530.

SYNTHESIS AND ANTIESTERASE ACTIVITY OF NEW FLUORINE-CONTAINING CARBAMATES

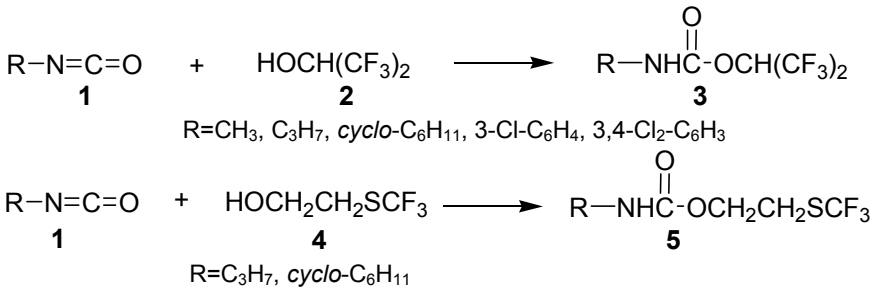
Mukhamadieva G.R., Boltneva N.P., Sokolov V.B., Makhaeva G.F.

Institute of Physiologically Active Compounds, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russia
e-mail: mukhamadieva@ipac.ac.ru

Fluorine has a unique combination of atomic physical properties compared to other halogens; in particular, it has the highest electronegativity and smallest size among these elements. The introduction of fluorine atoms into a molecule has an impact on its physical and chemical properties, with severe consequences on the biological activities. The strong electron-withdrawing effect of CF_3 groups modifies the pKa of neighboring functions, in particular enhances the acidic character of fluorinated alcohols.

Our previous study of the antiesterase activity of a series of *O*-phosphorylated hexafluoroisopropanoles demonstrated the prospects of using hexafluoroisopropanole fragment as a leaving group. A high selectivity for carboxylesterase was shown. [1-2]

The purpose of this study was to synthesize the previously unknown *O*-carbamoylated 1-hexafluoroisopropanoles **3** and *O*-carbamoylated 2-trifluoromethylthioethanoles **5** and to study their inhibitor activity against three serine esterases: human erythrocyte acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7), horse serum butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) and porcine liver carboxylesterase (CaE, EC 3.1.1.1). Carbamates **3** and **5** were obtained with quantitative yield by interaction of isocyanate **1** with 1-hydrohexafluoroisopropanole **2** or 2-trifluoromethylthioethanole **4** at 20°C in benzene.



Inhibitor activity was characterized with IC_{50} values. The tested carbamats were dissolved in DMSO. A sample of enzyme was incubated with the tested compound in the range of concentrations of $1x10^{-12}$ - $1x10^{-3}$M for 8 minutes at 25°C (2% DMSO, phosphate buffer (v/v)), then the residual enzyme activity was determined spectrophotometrically using the appropriate substrates.

Kinetic studies showed that *O*-carbamoylated hexafluoroisopropanoles **3** did not inhibit AChE, weakly inhibited BChE and exhibited selective inhibitor activity against CaE, the structure of R determined their efficiency and selectivity: IC_{50} values were from $1x10^{-3}$ to $5.23x10^{-7}$ M.

O-carbamoylated 2-trifluoromethylthioethanoles **5** also did not inhibit AChE, weakly inhibited BChE (IC_{50} = $7.26x10^{-4}$M, R=C_3H_7 and $1.11x10^{-3}$M, R=*cyclo*-C_6H_{11}) and more effectively inhibited CaE (IC_{50}= $9.44x10^{-5}$M, R=C_3H_7 and $5.63x10^{-5}$ M, R=*cyclo*-C_6H_{11}).

Thus, molecular design of the leaving group of carbamates by trifluoromethyl fragments enables to obtain effective and selective inhibitors of CaE which can be used as modulators of drugs and insecticides.

Supported by Program of Russian Academy of Sciences "Biomolecular and Medicinal chemistry" and grant RFBR (project № 11-03-00581-a).

References:

1. *G.F. Makhaeva, O.G. Serebryakova, N.P. Boltneva, T.G. Galenko, A.Y. Aksinenko, V.B. Sokolov, I.V. Martynov.* // Esterase profile and analysis of structure-inhibitor selectivity relationships for homologous hosphorylated 1-hydroperfluoroisopropanols - Dokl. Biochem. Biophys., 2008, v.423, p.352-357
2. *G.F. Makhaeva, A.Y. Aksinenko, V.B. Sokolov, O.G. Serebryakova, R.J. Richardson.* // Synthesis of organophosphates with fluorine-containing leaving groups as serine esterase inhibitors with potential for Alzheimer disease therapeutics - Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009, v.19, p. 5528-5530.

РАЗРАБОТКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ МЕТОДИК КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА КОМБИНИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ СУБСТАНЦИЙ МИЛДРОНАТА И L-АРГИНИНА ГИДРОХЛОГИДА

Назарова Е.С., Алмакаева Л.Г., Вербова Ю.М., Бегунова Н.В., Иванова А.А.

Государственное предприятие «Государственный научный центр лекарственных средств и изделий медицинского назначения» (ГП «ГНЦЛС»), Харьков, Украина
e-mail: nazarova@gncls.kharkov.ua

Разработка новых комбинированных препаратов на основе хорошо изученных действующих веществ является одним из перспективных направлений современной фармацевтической науки. Большинство болезней сердечно-сосудистой системы, хронические цереброваскулярные расстройства различной природы, тяжёлые нагрузки в спорте высоких достижений сопровождаются дефицитом внутриклеточного оксида азота (NO), накоплением в тканях свободных радикалов с накоплением в клетках недоокисленных продуктов жирных кислот, повреждением кардиомиоцитов и эндотелия сосудов, ухудшением локальной микроциркуляции и гемодинамики, и другими значительными метаболическими и функциональными системными расстройствами. Эндогенным источником NO в тканях является L-аргинина гидрохлорид. В условиях повышенной нагрузки равновесие между доставкой и потребностью клеток в кислороде восстанавливает милдронат, он устраняет накопление токсических продуктов обмена в клетках, защищая их от повреждения; оказывает тонизирующее влияние. В связи с этим целесообразным является разработка комбинированного препарата с L-аргинином гидрохлоридом и милдронатом, фармакологические эффекты которых взаимно дополняют друг друга, и их спектр потенциально охватывает широкий круг показаний к применению комбинированного препарата.

В ГП «ГНЦЛС» разработан новый оригинальный препарат в форме концентрата для инфузий, содержащий в качестве действующих веществ комбинацию милдроната и L-аргинина гидрохлорида, применяемый для метаболической терапии в кардиологии, неврологии, спортивной медицине и репродуктологии. Целью настоящей работы была разработка и стандартизация методик контроля качества комбинированного препарата с милдронатом и L-аргинина гидрохлоридом в форме концентрата для инфузий.

В методы контроля качества на комбинированный препарат с милдронатом и L-аргинина гидрохлоридом, концентрат для инфузий введены следующие показатели: Описание (прозрачная бесцветная или слегка желтоватая жидкость), Подлинность (методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в условиях проведения количественного определения; цветная реакция с раствора калия йодависмутата (реактивом Драгендорфа); характерная реакция на хлориды), Прозрачность (препарат должен быть прозрачным, ГФУ, 2.2.1), Цветность (не интенсивнее эталона BY_6, ГФУ 2.2.2, метод II), pH (от 5,5 до 7,0, ГФУ, 2.2.3, потенциометрически), Механические включения (должен соответствовать требованиям ГФУ, 2.9.19 и 2.9.20), Вещества, выявляемые нингидрином (не более 0,5 %, методом тонкослойной хроматографии, ГФУ, 2.2.27), Извлекаемый объем (не менее номинального, ГФУ, 2.9.17), Стерильность (препарат должен быть стерильным), Бактериальные эндотоксины, Аномальная токсичность, Количественное определение (методом ВЭЖХ, ГФУ, 2.2.29), Упаковка (по 5 мл в ампулы), Маркировка, Хранение (в защищенном от света месте при температуре не выше 25 ºС) и срок годности (1 год, наблюдение за сроком годности продолжается).

Проведенные исследования позволили разработать методику одновременного количественного определения L-аргинина гидрохлорида и милдроната метода ВЭЖХ с использованием хроматографической колонки Waters Spherisorb CNRP, размером (250x4,6) мм, заполненной сорбентом с размером частиц 5 мкм (температура колонки - 30 ºС, детектирование при длине волны 205 нм). В качестве подвижной фазы оптимальным является использование следующей смеси растворителей: ацетонитрил – буферный раствор pH 6,5 (1,2 г/л калия фосфата двухзамещенного) (4:96), при скорости - 1,0 мл/мин. В данных условиях хроматографирования время удерживание пика аргинина составило около 4,0-4,5 мин, а милдроната - около 6,0-6,5 мин, что позволило достигнуть полного разделения пиков действующих веществ при минимальном времени хроматографирования. Доказательство пригодности условий хроматографического определения в препарате обеспечивается введением в методику теста "Проверка пригодности хроматографической системы". Для раствора стандартных образцов L-аргинина гидрохлорида и милдроната в методику введены следующие условия пригодности хроматографической системы: коэффициент разделения пиков аргинина и милдроната, должен быть не менее 3,0; эффективность хроматографической колонки, рассчитанная для пика аргинина или милдроната должна быть не менее 2000 теоретических тарелок; относительное стандартное отклонение (RSD), рассчитанное для площадей пиков аргинина или милдроната должно соответствовать требованиям ГФУ, 2.2.46; коэффициент симметрии пиков аргинина или милдроната должен быть не более 2,0.

Выбранные условия были положены в основу методики количественного определения действующих веществ в готовом лекарственном препарате. Проведенная валидация методики подтвердила ее пригодность и соответствие критериям приемлемости. Данными по валидации подтверждено, что методика количественного определения L-аргинина гидрохлорида и милдроната позволяет проводить контроль препарата методом жидкостной хроматографии в необходимом диапазоне, с достаточной специфичностью, правильностью и сходимостью. Валидационные характеристики свидетельствуют о корректности методики количественного определения при допусках для действующих веществ ±5 %.

DEVELOPMENT AND STANDARDIZATION OF PROCEDURES FOR QUALITY CONTROL OF COMBINED DRUG BASED ON SUBSTANCES MILDRONATE AND L-ARGININE GIDROHLOGIDA

Nazarova E.S., Almakaeva L.G., Verbova Y.M., Begunova N.V., Ivanova A.A.

State Enterprise "State Scientific Center for Drug", Kharkov, Ukraine
e-mail: nazarova@gncls.kharkov.ua

Development of new combination therapies based on the well-studied active ingredients is one of the promising areas of modern pharmaceutical science. Most diseases of the cardiovascular system, chronic cerebrovascular disorders of different nature, the heavy workload in the sport of high achievements are accompanied by a deficit of intracellular nitric oxide (NO) accumulation in tissues with accumulation of free radicals in cells unoxidized products of fatty acids, damage of cardiomyocytes and vascular endothelial deterioration of local microcirculation and hemodynamics, and other significant systemic metabolic and functional disorders. Endogenous source of NO in tissue is an L-arginine hydrochloride. Under heavy load, the balance between delivery and the need for cells to oxygen restores mildronate, it eliminates the accumulation of toxic metabolic products in cells, protecting them from damage, has a tonic effect. In this connection it is expedient to develop a combined preparation with L-arginine hydrochloride and mildronate, the pharmacological effects of which are mutually complementary, and their range of potentially covers a wide range of indications for the use of combined drug: coronary heart disease, congestive heart failure, chronic cerebrovascular insufficiency, state after acute ischemic stroke, vascular pathology and degenerative diseases of the retina; withdrawal syndrome in chronic alcoholism; stimulation of spermatogenesis in male infertility, decreased performance, heavy mental and physical stress, including in the sport of high achievements.

In SE "State Scientific Center for Drug" has developed a new original drug in the form of a concentrate for infusion containing as active ingredients a combination mildronate and L-arginine hydrochloride, used for metabolic therapy in cardiology, neurology, sports medicine and reproduction. The purpose of this study was to develop and standardize methods of quality control combined with the drug mildronate and L-arginine hydrochloride in the form of a concentrate for infusion.

In the quality control methods in combination with drug mildronate and L-arginine hydrochloride, a concentrate for infusion introduced the following indices: Description (clear, colorless or slightly yellow liquid), Identification (high performance liquid chromatography (HPLC) in terms of quantification, color reaction with solution of potassium yodavismutata (Reagent Dragendorfa); typical reaction to chlorides), Appearance of solution (the drug is clear (State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU), 2.2.1), not more intensely coloured than reference solution BY_6 (SPU,2.2.2, Method II)), pH (from 5.5 to 7,0, SPU, 2.2.3, potentiometry), Particulate contamination (must conform to the requirements of SPU, 2.9.19 and 2.9.20), The substances detected by ninhydrin (not more than 0,5% by TLC, SPU, 2.2.27), Extractable volume (not less than nominal, SPU, 2.9.17), Sterility (the drug must be sterile), Bacterial endotoxins, Abnormal toxicity, Assay (HPLC, SPU, 2.2.29), Packaging (5 ml ampoule), marking, storage (protected from light at temperature above 25 ºC) and shelf life (1 year, monitoring the shelf life continues).

Our studies have allowed to develop a method of simultaneous quantitative determination of L-arginine hydrochloride and mildronate HPLC method using a chromatographic column Waters Spherisorb CNRP, size (250x4,6) mm, filled with a sorbent with a particle size of 5 microns (column temperature - 30 ºC, detection at a wavelength 205 nm). As the mobile phase is optimal to use the following solvent mixtures: acetonitrile - buffer pH 6,5 (1,2 g/l potassium hydrogen phosphate) (4:96), at a rate of - 1.0 ml/min. Under these conditions, chromatographic retention time peak of arginine was about 4,0-4,5 min and mildronate - about 6,0-6,5 min, which allowed it to achieve complete separation of the peaks of active substances with a minimum time of chromatography. The proof of the suitability of conditions for the chromatographic determination of a drug provides an introduction to the methodology of the test, "Testing the suitability of the chromatographic system". For the solution of standard samples of L-arginine hydrochloride and mildronate the methodology we have introduced the suitability of the chromatographic conditions of the system: the separation factor of the peaks of arginine and mildronate shall not be less than 3.0, the effectiveness of the chromatographic column, calculated for the peak of arginine or mildronate should not be less than 2000 theoretical plates; relative standard deviation (RSD), calculated for the peak area of arginine or mildronate must meet the requirements of SPU, 2.2.46; coefficient of symmetry of the peaks of arginine or mildronate should be no more than 2,0.

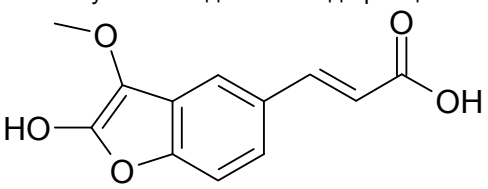
The selected chromatographic conditions, and were the basis of methods of quantitative determination of active substances in the finished product. Validation methodology proved its suitability and eligibility. Data validation confirmed that the method for quantitative determination of L-arginine hydrochloride and mildronate allows control of the drug by liquid chromatography in the proper range, with sufficient specificity, accuracy and convergence. Validation characteristics of show on the correct method for quantitative determination of tolerance to the active substances ± 5%.

АМІНОКИСЛОТНІ ПОХІДНІ ЗАМІЩЕНИХ 3-(6-МЕТОКСИ-1-БЕНЗОФУРАН-5-ІЛ)-2-БУТЕНОВИХ КИСЛОТ

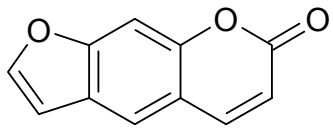
Нечай М.П., Шилін С.В., Хиля В.П.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail: varang77@ukr.net

Перспективним шляхом пошуку нових фізіологічно активних речовин є створення синтетичних аналогів природних молекул та їх подальша модифікація.



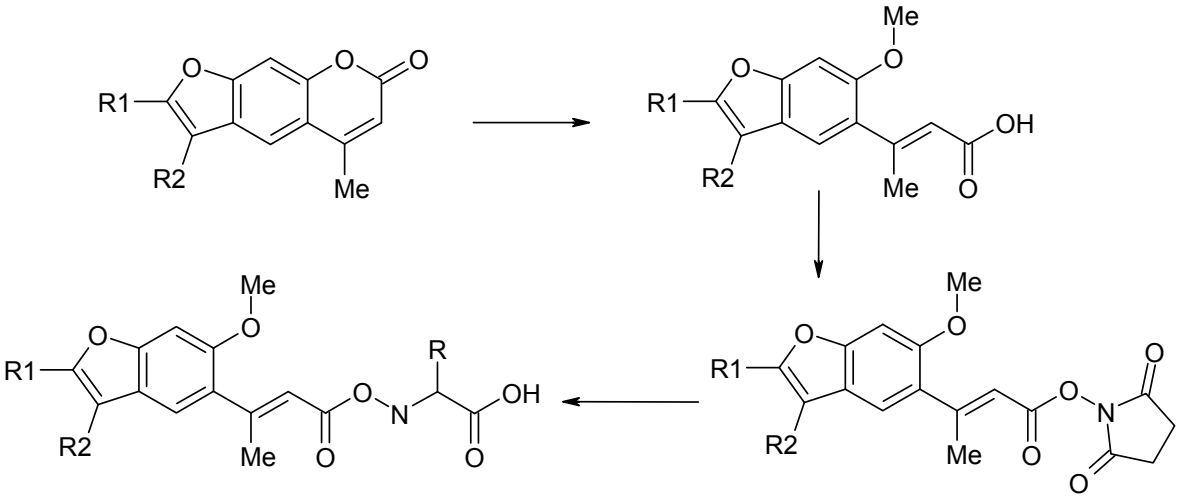
1



2

Нами синтезовано ряд фурилкоричних кислот, які є аналогом природної сполуки 1 [1]. В якості вихідних речовин були використані заміщені фурокумарини – аналоги природного фурокумарину псоралену 2. При розкритті кумаринового циклу в лужних умовах в присутності алкілуючого агенту утворюються відповідні кислоти, бензофурановий цикл зберігається.

На основі отриманих кислот з використанням методу активованих естерів [2] нами отримано низку їх амінокислотних похідних. Активацію карбоксильної функції здійснювали за рахунок N-гідроксисукцинімідних естерів, які проявляють високу реакційну здатність в реакціях амінолізу, і, як правило, характеризуються відсутністю рацемізації при їх використанні. Такий підхід дозволяє одержати сполуки, які поєднують в собі декілька фармакофорних центрів, що робить цікавим дослідження їх біологічної активності.



R1, R2= alkyl, aryl; R=залишок амінокислоти

Література:

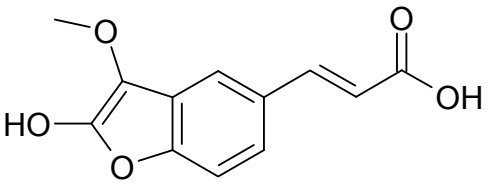
1. *Barik, B.R.; Kundu, A.B.:* A cinnamic acid derivative and a coumarrin from *Murraya Exotica*
2. *А.А. Гершкович, В.К. Кибирев.* Химический синтез пептидов / – К. : Наукова думка, 1992. – 360 с.

AMINO ACID DERIVATIVES OF SUBSTITUTED 3-(6-METHOXY-5-BENZOFURANYL)-2-BUTENOIC ACIDES

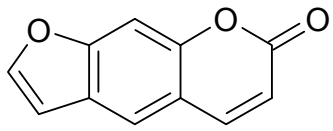
Nechai M.P., Shilin S.V., Khilya V.P.

Taras Shevchenko Natiional University of Kiev, Ukraine
e-mail: varang77@ukr.net

The perspective way of search of new physiological active matters is creation of synthetic analogues of natural molecules and them subsequent modification.



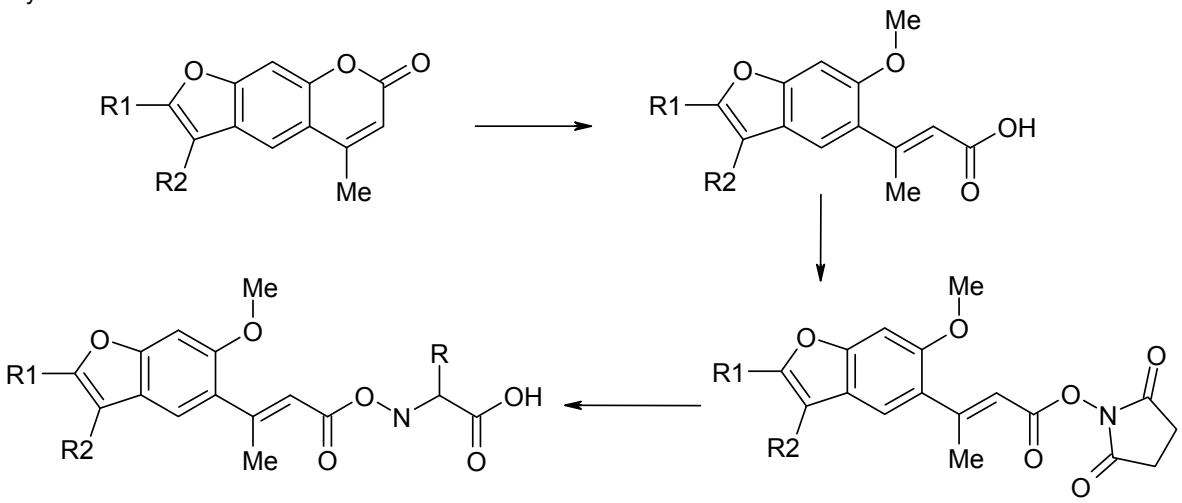
1



2

We are synthesize the series of furilcinnamic acids which are the analogue of natural compound 1 [1]. As initial substances were used substituted furocoumarines - natural analogues of furocoumarinic psoralen 2. At the opening of coumarin cycle in alkaline conditions in the presence of alkylating agent formed corresponding acid, benzofurane cycle persists.

Based on the acid using the method of activated esters [2] we obtained a number of amino acid derivatives. Activation carboxyl functions carried out by N-hydroxysuccinimide esters, which show high reactivity in aminolysis reactions, and is usually characterized by a lack racemization when used. This approach allows to obtain compounds that combine several pharmacophore centers, which makes an interesting study of their biological activity.



R1, R2= alkyl, aryl; R=amino acid reside

References:
1.*Barik, B.R.; Kundu, A.B.:* A cinnamic acid derivative and a coumarrin from *Murraya Exotica*
2.*А.А. Гершкович, В.К. Кибирев.* Химический синтез пептидов / – К. : Наукова думка, 1992. – 360 с.

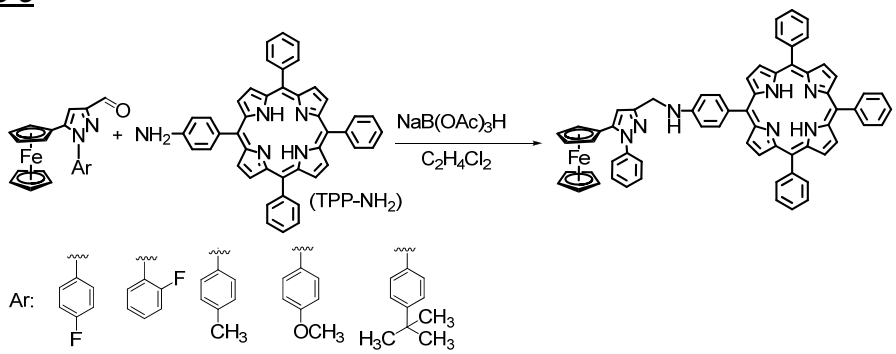
ФЕРРОЦЕНИЛПОРФИРИНЫ КАК УНИКАЛЬНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ

Осипова Е.Ю., Сименел А.А., Белоусов Ю.А., Родионов А.Н.

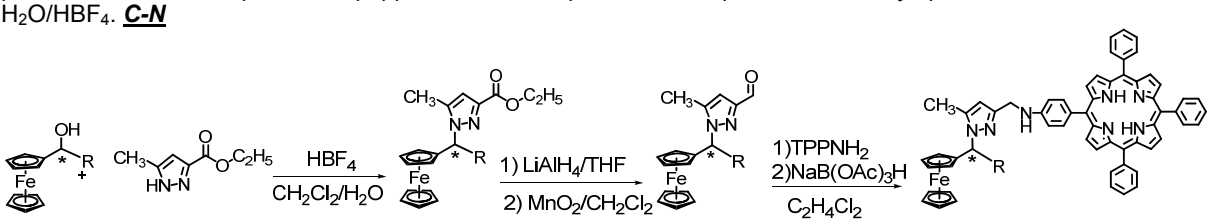
Институт элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова Российской академии наук, Москва, Россия
e-mail: anel-86@mail.ru

В последнее время соединения ферроцена с порфиринами из-за их уникальных структурных и электрохимических свойств являются объектами различных исследований. Такие структуры нашли применение в качестве эффективных искусственных моделей фотосинтеза, в области молекулярного распознавания. Кроме того, высокая электрохимическая активность позволяет использовать ферроценсодержащие порфирины в качестве молекулярных накопителей информации [1].

Более того, известно, что гетероциклические соединения ферроцена проявляют различную биологическую (противоопухолевую, антибактериальную, противомикробную) активность в сочетании с низкой токсичностью для организма [2,3]. Порфирины в свою очередь нашли успешное применение в фотодинамической терапии за счёт своей способности накапливаться преимущественно в раковых клетках [4,5]. Эти факты явились достаточными предпосылками для синтеза ферроценсодержащих порфиринов, в которых ферроцен связан с порфирином через гетероциклический фрагмент. При этом были получены 2 основные группы соединений: в первой гетероцикл связан через атом углерода, во второй – через азот. В качестве порфириновой компоненты мы использовали хорошо известный тетрафенилпорфиринамин (TPP-NH_2). При взаимодействии TPP-NH_2 с ферроценилформилпиразолами в условиях реакции аминоалкилирования (восстановительного аминирования) были получены целевые соединения. ***C-C***



Для синтеза соединения со связью C-N между ферроценом и гетероциклическим ядром была изучена региоселективность реакции ферроценилалкилирования гетероциклов в двухфазной системе CH_2Cl_2-H_2O/HBF_4. ***C-N***



R: $-CH_3$, $-C_2H_5$, $-C_6H_5$

Синтезированы металлические комплексы ферроценопорфиринов, исследован их электрохимический характер. Были изучены подходы к синтезу оптически активных ферроценовых производных порфиринов. Планируются биологические испытания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук (программа Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине»), Отделения химии и наук о материалах Российской академии наук (программа фундаментальных исследований «Медицинская и биомедицинская химия») и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 09-03-00535).

Литература:

1. *C. Bucher, C.H. Devillers et al* Ferrocene-appended porphyrins: Syntheses and properties, Coord. Chem. Rev. 2009, 253, 21-31.
2. *Л.В. Снегур, В.Н. Бабин, А.А. Сименел, Ю.С. Некрасов, Л.А. Островская, Н.С. Сергеева,* Противоопухолевая активность соединений ферроцена, Изв. АН. Сер. хим., 2010, 2113-2124.
3. A.*A. Simenel, G.A. Dokuchaeva, L.V. Snegur et al.*, Ferrocene-modified thiopyrimidines: synthesis, enantiomeric resolution, antitumor activity, Appl. Organomet. Chem., 2011, 25, 70-75.
4. *А.Ф. Миронов*, Фотодинамическая терапия рака – новый эффективный метод диагностики и лечения злокачественных опухолей, СОЖ, 1996, 8, 32-40.
5. *D. K. Deda, A. F. Uchoa, E. Carità et al.,* A new micro/nanoencapsulated porphyrin formulation for PDT treatment, Int. J. Pharm. 2009, 376, 76-83.

FERROCENE PORPHYRINS AS UNIQUE BIOLIGICAL STRUCTURES

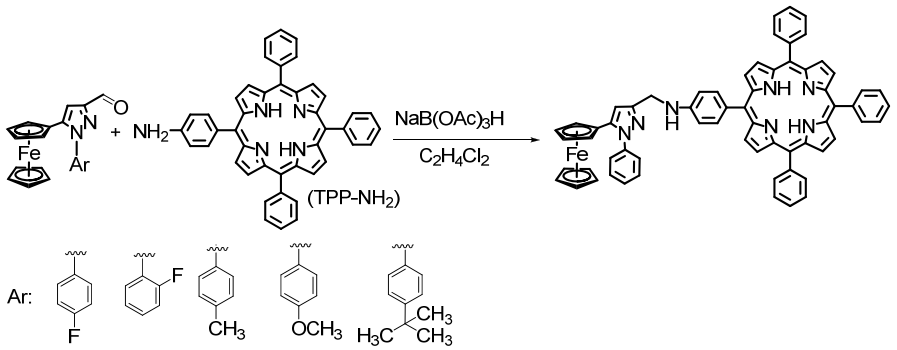
Osipova E.Yu., Simenel A.A., Belousov Yu.A., Rodionov A.N.

N. Nesmeyanov Institute of OrganoElement Compounds, Russian academy of Sciences, Moscow, Russia
e-mail: anel-86@mail.ru

During the last decades compounds of ferrocene with porphyrins are in the area of scientific interest because of their unique structural and electrochemical properties. Such structures have found application as effective artificial photosynthesis models and in molecular recognistion. Furthermore, the higher electrochemical activity permits to use ferrocene containing porphyrins for multibit information storage at the molecular level [1].

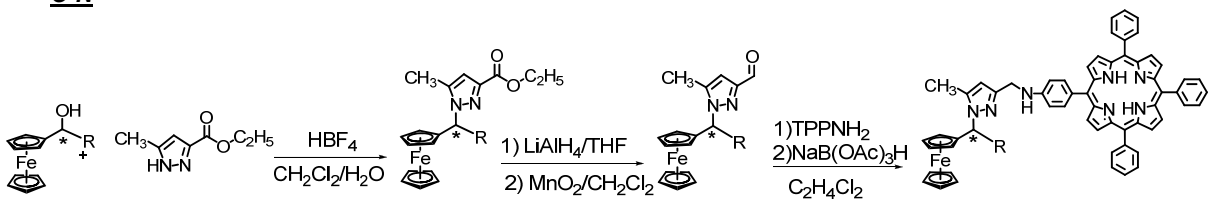
Moreover, heterocyclic ferrocene compounds are known to exhibit various biological (antitumor, antibacterial, antimicrobial) activities combined with low toxicity for the organism [2, 3]. Porphyrins in turn found successful application in photodynamic therapy due to its ability to accumulate mainly in cancer cells [4, 5]. These facts were sufficient precondition for the synthesis of ferrocene-containing porphyrins, in which ferrocene linked to porphyrin through the heterocyclic fragment. In this case, were obtained two main groups of compounds: in the first heterocycle linked by carbonyl atom, in the second – through the nitrogen. As the porphyrin component, we used a well-known tetraphenylporphyrinamin (TPP-NH_2). The interaction of TPP-NH_2 with ferrocenylformylpyrazoles under aminoalkylation reaction conditions (reductive amination) led to target compounds.

C-C



For the synthesis of compounds with C-N bond between the ferrocene and the heterocyclic nucleus regioselectivity of heterocyclic ferrocenylalkylation reaction in two-phase system CH_2Cl_2-H_2O/HBF_4 was studied.

C-N



R: $-CH_3$, $-C_2H_5$, $-C_6H_5$

Metal complexes of resulted compounds were obtained, their electrochemical characteristics were studied. Approaches to the synthesis of optically active ferrocene-based porphyrins were studied. Biological tests are planned.

This work was supported by the Russian Academy of Sciences (Presidium Program "Fundamental Sciences – for Medicine"), by the Department of Chemistry and Materials Science (Program 'Medicinal and Biomolecular Chemistry'), and by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR No 09-03-00535).

References:

1. C. *Bucher, C H. Devillers et al* Ferrocene-appended porphyrins: Syntheses and properties, Coord. Chem. Rev. 2009, 253, 21-31.
2. *L.V. Snegur, V.N. Babin, A.A. Simenel, Yu.S. Nekrasov, L.A. Ostrovskaya, N.S. Sergeeva,* Antitumor activities of ferrocene compounds, Russ. Chem. Bull., 2010, No. 12.
3. *A.A. Simenel, G.A. Dokuchaeva, L.V. Snegur et al.,* Ferrocene-modified thiopyrimidines: synthesis, enantiomeric resolution, antitumor activity, Appl. Organomet. Chem., 2011, 25, 70-75.
4. *A.F. Mironov,* Photodynamic cancer theraphy – new effective method for diagnosis and treatment of malignant tumors, SOJ, 1996, 8, 32-40.
5. *D. K. Deda, A. F. Uchoa, E. Caritá et al.,* A new micro/nanoencapsulated porphyrin formulation for PDT treatment, Int. J. Pharm. 2009, 376, 76-83.

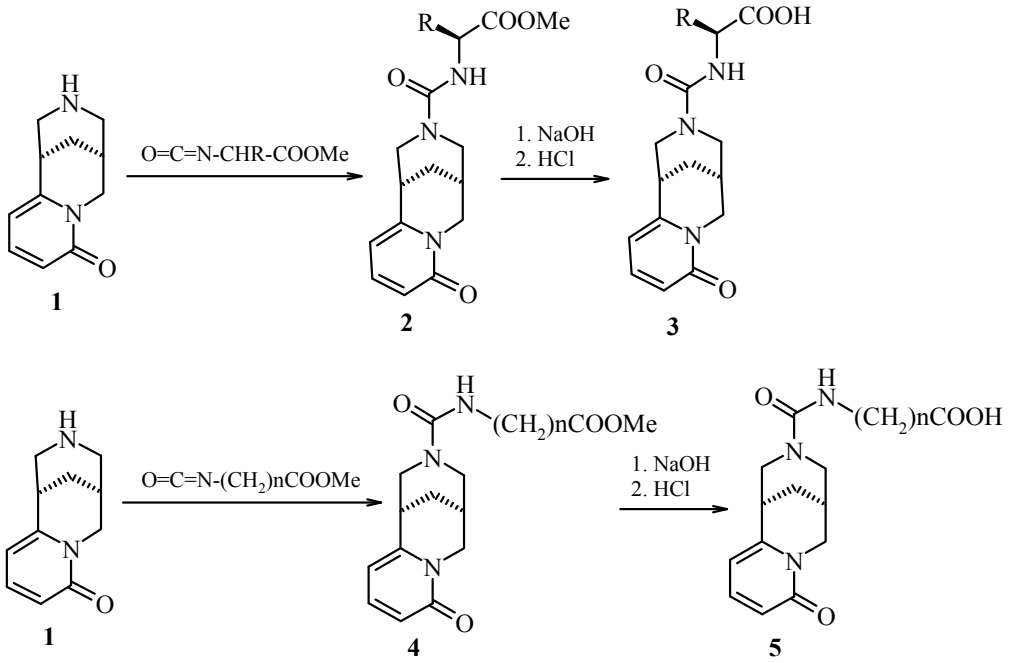
СИНТЕЗ N-АЦИЛАМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ЦИТИЗИНА

[1]Патрикей С.Ю., [1]Язловицкий А.В., [1]Гаразд М.М., [1]Огороднийчук А.С., [2]Виноградова В.И.

[1]Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: gmm@i.com.ua
[2] Институт химии растительных веществ им. академика С.Ю. Юнусова АН РУз, Ташкент, Узбекистан

Интерес к исследованиям по химической модификации алкалоида цитизина обусловлен широким спектром биологической активности производных цитизина. Важная роль аминокислот в процессах жизнедеятельности стимулирует исследования по проведению поиска новых биологически активных соединений среди природных аминокислот, их синтетических аналогов и разнообразных соединений, содержащих аминокислотные остатки. Введение в структуру цитизина в качестве заместителя аминокислотного фрагмента представляет интерес как для теории органического синтеза, так и для целенаправленного синтеза новых биологически активных соединений.

В результате взаимодействия цитизина с изоцианатами эфиров аминокислот (глицина, L-аланина, L-валина, L-метионина, L-лейцина, L-изолейцина, L-фенилаланина, β-аланина и 6-аминокапроновой кислоты) получены соответсвующие эфиры **2** и **4**. Щелочной гидролиз указанных эфиров приводит к образования функционализированных производных цитизина **3** и **5**, содержащих свободную карбоксильную функцию и представляют интерес как потенциальные биологически активные вещества и многоцелевые синтоны органического синтеза.



R=H, CH_3, $CH(CH_3)_2$, $CH_2CH_2SCH_3$; $CH_2CH(CH_3)_2$, $CH(CH_3)CH_2CH_3$, $CH_2C_6H_5$;
n=2, 5

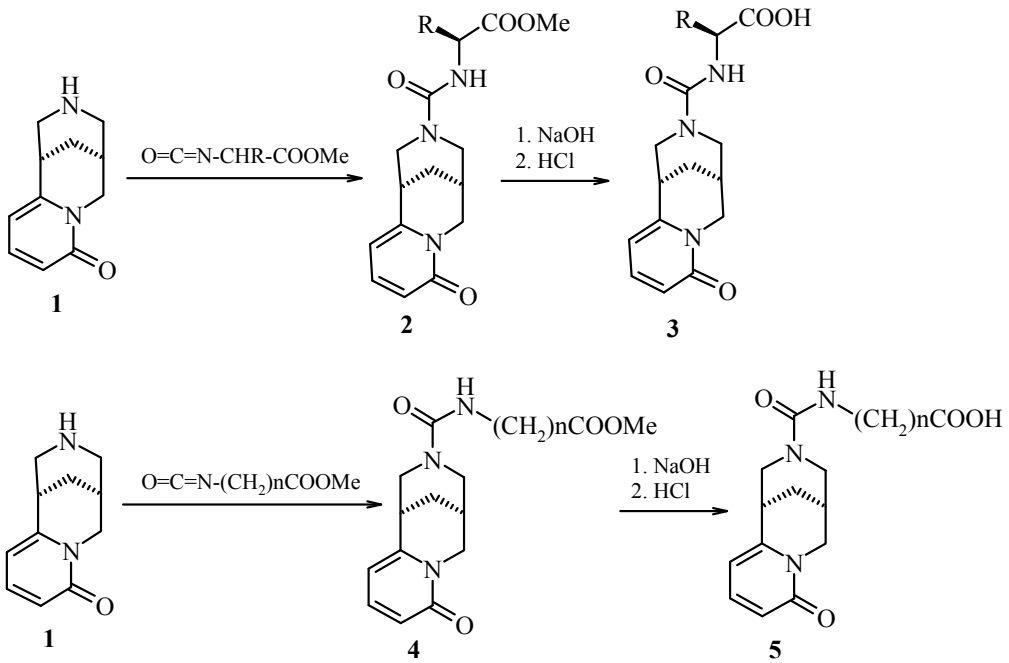
SYNTHESIS OF N-ACYLAMINOACIDS DERIVATIVES OF CYTISINE

[1]Patrykey S.Yu., [1]Yazlovitskiy A.V., [1]Garazd M.M., [1]Ogorodniychuk O.S., [2]Vinogradova V.I.

[1]Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: gmm@i.com.ua
[2] S. Yu. Yunusov Institute of the Chemistry of Plant Substances, Tashkent, Republic of Uzbekistan

Interest in research on chemical modification of the alkaloid cytisine caused a wide spectrum of biological activity of derivatives of cytisine. The important role of amino acids in the life stimulates research on the search for new biologically active compounds among the natural amino acids, their synthetic analogs and a variety of compounds containing amino acid residues. Introduction to the structure of cytisine as substituent amino acid fragment of interest for the theory of organic synthesis, and for the purposeful synthesis of new biologically active compounds.

The interaction of cytisine with isocyanates esters of amino acids (glycine, L-alanine, L-valine, L-methionine, L-leucine, L-isoleucine, L-phenylalanine, β-alanine and 6-aminocaproic acid) were obtained by appropriate esters **2** and **4**. Alkaline hydrolysis of these esters leads to the formation of functionalized derivatives of cytisine **3** and **5**, containing a free carboxyl function and are of interest as potential biologically active substances and multipurpose synthons in the organic synthesis.



R=H, CH_3, $CH(CH_3)_2$, $CH_2CH_2SCH_3$; $CH_2CH(CH_3)_2$, $CH(CH_3)CH_2CH_3$, $CH_2C_6H_5$;
n=2, 5

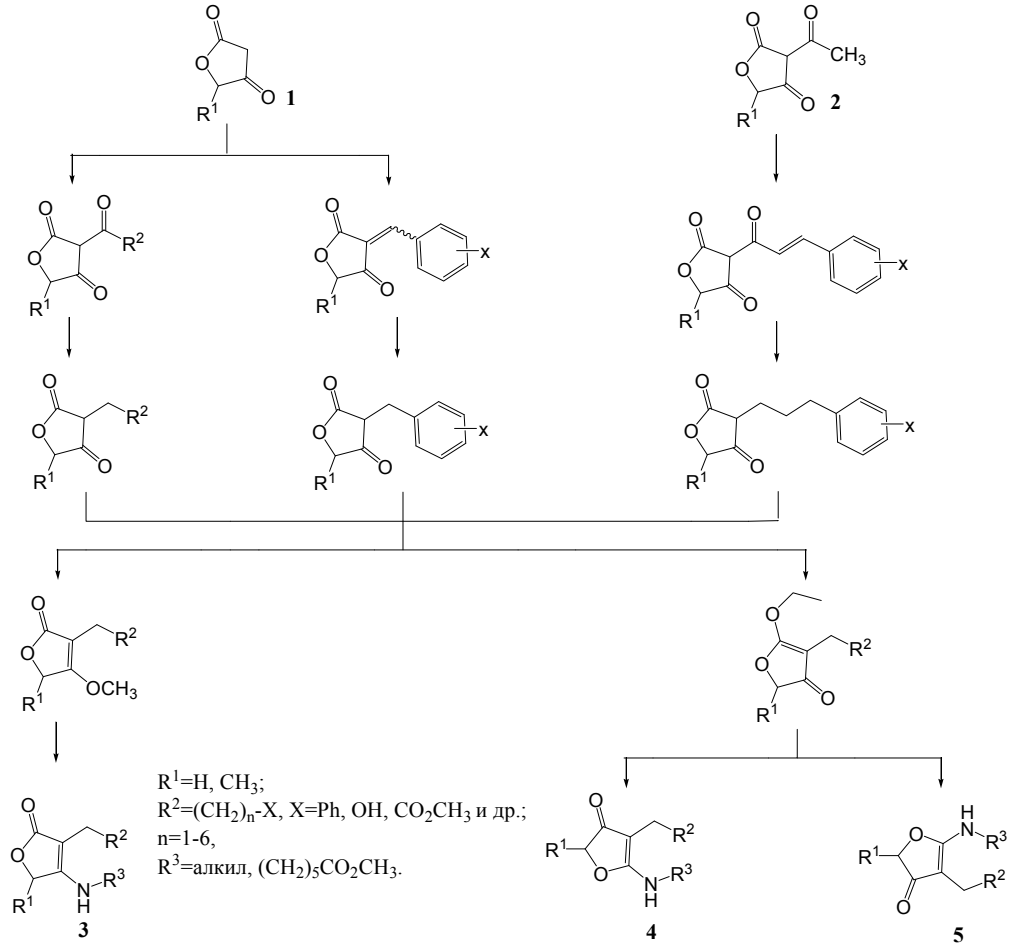
СИНТЕЗ ИММУНОТРОПНЫХ ГЕТЕРОПРОСТАНОИДОВ НА ОСНОВЕ ТЕТРОНОВЫХ И 3-АЦЕТИЛТЕТРОНОВЫХ КИСЛОТ

Пашковский Ф.С., Лахвич Ф.А.

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: pashkovsky61@mail.ru

На основе тетроновых **(1)** и 3-ацетилтетроновых **(2)** кислот нами осуществлен синтез новых биоактивных 10-окса-13-аза- **(3)**, 11-окса-13-аза- **(4)** и 7-аза-9-оксапростаноидов **(5)**. Следует отметить, что тетроновые кислоты являются структурным фрагментом большого ряда природных соединений и служат удобными полифункциональными предшественниками в синтезе физиологически активных веществ различных классов [1].

Пути формирования структуры гетеропростаноидов **(3-5)** представлены на схеме.



В результате биологических испытаний полученных гетеропростаноидов установлена взаимосвязь «структура-иммунотропная активность», обнаружены охраноспособные низкотоксичные гетеропростаноиды, обладающие как высокой иммуностимулирующей, так и иммуносупрессивной активностью [2]. Полученные соединения перспективны для разработки на их основе оригинальных лекарственных средств для нужд медицины и могут найти дальнейшее практическое применение в качестве высокоэффективных иммуномодуляторов новых поколений.

Литература:

1. *A. Zografos, D.Georgiadis.* // Synthetic Strategies towards Naturally Occurring Tetronic Acids. – Synthesis, 2006, N 19, p. 3157-3188.
2. *Б.Б. Кузьмицкий, М.Б. Голубева, Г.С. Любин, Ф.С. Пашковский, Е.М. Щукина, Ф.А. Лахвич.* // Модифицированные простагландины – биорегуляторы функций иммунной системы и воспаления. – Сб. науч. трудов «Биорегуляторы: исследование и применение», вып. 2, Мн.: Белорусская наука, 2008. – С. 33-39.

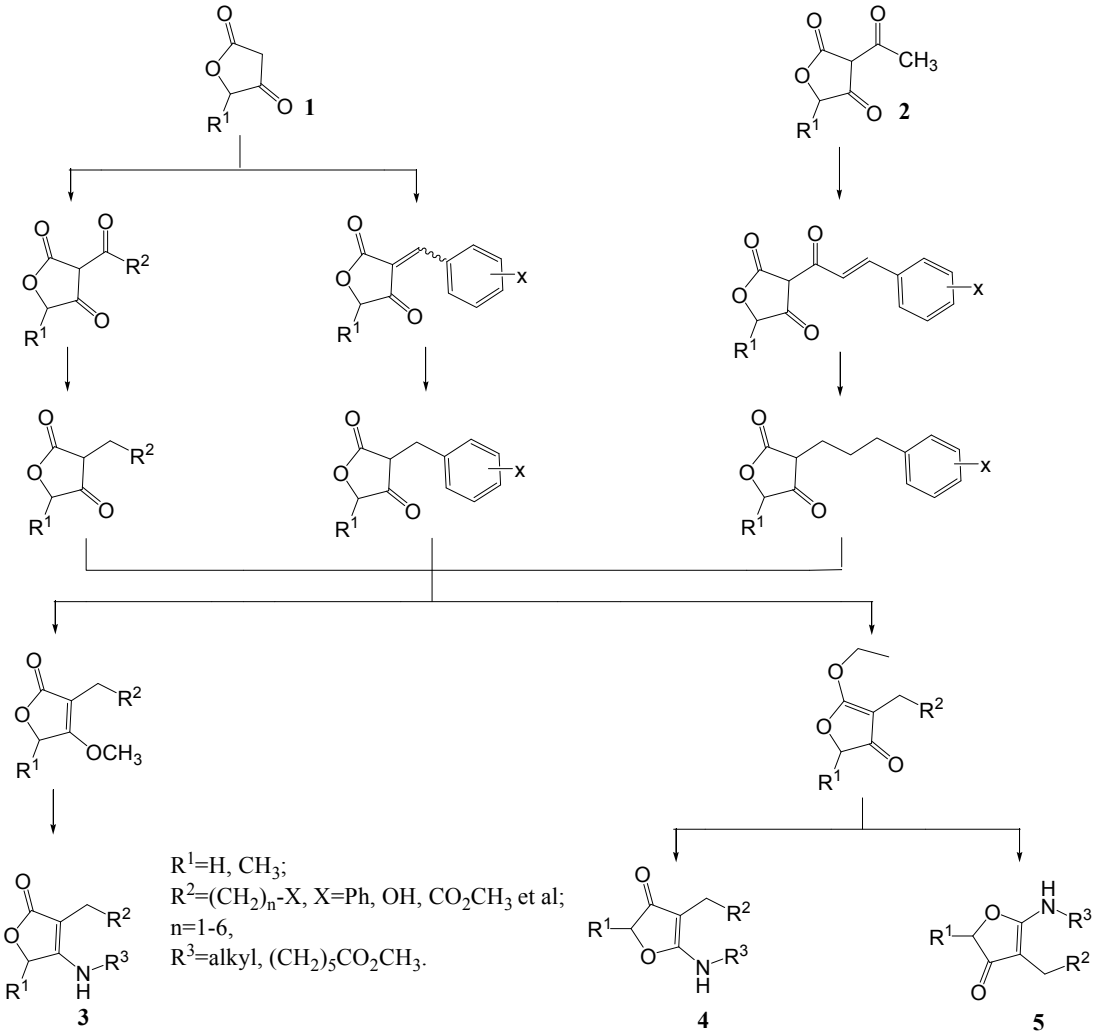
SYNTHESIS OF IMMUNOTROPIC HETEROPROSTANOIDS ON THE BASIS OF TETRONIC AND 3-ACETYLTETRONIC ACIDS

Pashkovsky F.S., Lakhvich F.A.

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: pashkovsky61@mail.ru

On the basis of tetronic **(1)** and 3-acetyltetronic **(2)** acids we have developed the synthesis of new bioactive 10-oxa-13-aza- **(3)**, 11-oxa-13-aza- **(4)** and 7-aza-9-oxaprostanoids **(5)**. It should be noted that tetronic acids are structural fragments of a great number of natural compounds and they serve as versatile multifunctional precursors in the synthesis of physiologically active compounds of different classes [1].

Approaches to construction of the heteroprostanoids **(3-5)** are depicted in the scheme.



As a result of biological assay of the heteroprostanoids obtained structure-immunotropic activity relationship has been determined. It has been shown that a number of heteroprostanoids possess high immunostimulating as well as immunosuppressive activity [2]. These compounds are perspective for development of original pharmaceuticals on their basis for medical purposes. New heteroprostanoids can find practical application as effective immunomodulators of new generation.

References:

1. *A. Zografos, D.Georgiadis.* // Synthetic Strategies towards Naturally Occurring Tetronic Acids. – Synthesis, 2006, N 19, p. 3157-3188.
2. *Kuz'mitskii B.B., M.B. Golubeva, G.S. Lyubin, F.S. Pashkovskii, E.M. Shchukina, F.A. Lakhvich.* // Modified prostaglandins – bioregulators of functions of immune system and inflammation. – Comp. sci. trans. «Bioregulators: exploration and application», вып. 2, Minsk: Belorusskaya nauka, 2008. – p. 33-39.

ФОРМИРОВАНИЕ НАНОЧАСТИЦ И НАНОКЛАСТЕРОВ СЕРЕБРА В МАТРИЦАХ ДИБЛОК-СОПОЛИМЕРОВ, СОСТОЯЩИХ ИЗ МЕТОКСИПОЛИЭТИЛЕНОКСИДА И ПОЛИАКРИЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Пермякова Н., Желтоножская Т., Грищенко Л.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина
e-mail permyakova@ukr.net

Специфические свойства металлов в нанодисперсном состоянии открывают широкие возможности для создания новых эффективных препаратов с высокой биологической активностью для применения в экологии, медицине и сельском хозяйстве. Одной из важнейших проблем является синтез достаточно стабильных наночастиц заданного размера, в течение длительного времени сохраняющих высокую химическую и биологическую активность. Известно, что наночастицы и кластеры Ag активно взаимодействуют с биомолекулами [1], обладают биологической активностью по отношению к стволовым клеткам человека [2], эффективно применяются в нанобиотехнологиях благодаря своим антибактериальным свойствам [3]. В настоящей работе рассмотрены основные особенности формирования наночастиц и кластеров серебра, полученных методом химического восстановления в водных растворах диблок-сополимеров (ДБС) на основе метоксиполитэтиленоксида и полиакриловой кислоты (МОПЭО-*b*-ПАК) с различной длиной блока полиакриловой кислоты и различной степенью ионизации карбоксильных групп.

Образцы ДБС были синтезированы путем радикальной блок-сополимеризации метоксиполиэтиленгликоля (МОПЭГ M_v=5 кДа) с полиакриловой кислотой (ПАК). Использовали окислительно-восстановительную реакцию образования макрорадикалов. В качестве окислителя применяли соль Ce^{IV}. Блок-сополимеризацию проводили при постоянном соотношении [МОПЭО]/[Ce^{1V})]=1 ($моль_{МОПЭО}/моль_{CeIV}$). Для получения ДБС с различной длиной ионогенного блока варьировали концентрацию мономера (АК) в реакционной смеси. Синтезированные ДБС МОПЭО-*b*-ПАК в Na^+ и H^+ формах охарактеризованы методами ^{1}H ЯМР, ДСК и потенциометрического титрования. Установлено, что в области низких pH, где большая часть карбоксильных групп блока ПАК неионизирована ($\alpha \leq 0.32$), макромолекулы ДБС представляют собой интрамолекулярные поликомплексы. Гидрофобные взаимодействия между неполярными связанными сегментами обоих блоков ДБК в водной среде при низких pH вызывают интенсивную мицеллизацию макромолекул сополимера при pH≤4:

МОПЭО-*b*-ПАК
pH≤4

МОПЭО-*b*-ПАNa
pH>4

Наночастицы Ag были получены химическим восстановлением Ag^+ из $AgNO_3$, используя борогидрид натрия ($NaBH_4$) как восстановитель, в щелочных растворах депротонированного МОПЭО-*b*-ПАNa (pH=9). Интенсивно окрашенный, стабильный в течение длительного времени гидрозоль малых (5-10 нм) наночастиц Ag, имеющих характерную полосу поглощения в видимой области с максимумом при 408 нм образуется при следующих мольных соотношениях компонентов реакционных смесей (МОПЭО-*b*-ПАNa/$AgNO_3$+$NaBH_4$): [Ag^+]/[ПАNa]=0.01 – 0.04 и [$NaBH_4$]/[Ag^+]=8 – 80. Показано формирование наночастиц Ag в мицеллах протонированного МОПЭО-*b*-ПАК (pH=3) при [$NaBH_4$]/[Ag^+]=8. Синтез наночастиц Ag в мицеллярных структурах ДБК, по сравнению с восстановлением Ag^+ в макромолекулярных растворах, осуществляется в более организованной среде, способствующей быстрому формированию наноструктурных агрегатов. Увеличение в реакционной смеси МОПЭО-*b*-ПАК/$AgNO_3$+$NaBH_4$ соотношения [$NaBH_4$]/[Ag^+] до 80 приводит к возрастанию pH реакционных смесей до 6 и, соответственно, к разрушению мицеллярной фазы сополимера. В этом случае наблюдается неполное восстановление катионов Ag^+ до нанокластеров. Образование устойчивых, линейных, положительно заряженных нанокластеров Ag_4^{2+}, стабилизированных поликислотным блоком сополимера, сопровождается появлением в электронных спектрах длинноволновой полосы поглощения так называемого “синего серебра” с максимумом при λ~800 нм. Кинетические и оптические свойства, стабилизированных в матрицах ДБК дисперсий наночастиц и нанокластеров Ag, обсуждены.

Литература:

1. *M. Veerapandian, K. Yun.* // Synthesis of Silver Nanoclusters and Functionalization with Glucosamine for Glyconanoparticles - Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry, 2010, 40, P.56–64,
2. *S. Kittler, C. Greulich, M.Köller, M. Epple.* // Synthesis of PVP-coated silver nanoparticles and their biological activity towards human mesenchymal stem cells - Mat.-wiss. u. Werkstofftech., 2009, 40, № 4, P. 258-264.
3. *M.V. Varghese, R. S. Dhumal, S. S. Patil, A. R. Paradkar, P. K. Khanna* // Synthesis and In-Vitro Antimycobacterial Studies of Cysteine Capped silver Nano-Particles - Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry, 2009, 39, P.554–558.

FORMATION OF SILVER NANOPARTICLES AND NANOCLUSTERS IN MATRICES OF DIBLOCK COPOLYMERS CONSISTING METHOXYPOLY(ETHYLENE OXIDE) AND POLY(ACRYLIC ACID)

Permyakova N., Zheltonozhskaya T., Grischenko L.

Kiev National Taras Shevchenko University, Faculty of Chemistry, Kiev, Ukraine
e-mail: permyakova@ukr.net

Nanoparticles are widely used for targeted drug delivery and for other biomedical applications. Particularly silver nanoparticles and nanoclusters have gained much importance in nanobiotechnology due to their biological and antimicrobial activity. Well known, that the silver nanoparticles and nanoclusters active interaction with a biomolecules [1], have a biological activity on human mesenchymal stem cells [2], antimicrobial and anti cancer properties [3] and also could be used as a diagnostic tool. In the present work the main peculiarities of the formation of the silver nanoparticles and nanoclusters, which were obtained by the chemical reduction in the solutions of the diblock copolymers (DBC) containing methoxy-poly(ethylene oxide) and poly(acrylic acid) (MOPEO-*b*-PAAc) with a different length of polyacid block and the different ionization degree of carboxylic groups, are considered.

MOPEO-*b*-PAAc samples were synthesized by a free radical block copolymerization of PAAc with methoxy-poly(ethylene glycol) (M_{vMOPEG}=5 kDa), which was activated by Ce^{IV} ions and used as macroinitiators. Polymerization of MOPEO-*b*-PAAc was performed at the constant molar ratio $[Ce^{IV}]/[MOPEG]=1$ (mol Ce^{IV} /base-mol MOPEG). The monomer concentration in the reaction mixture was changed from 0.5 to 2 mol AAc/base-mol MOPEG. DBC were characterized using ^1H NMR spectroscopy, DSC and potentiometric titration. It was revealed the intramolecular complex formation between MOPEO and PAAc blocks at low pH. The hydrophobic interactions between non-polar bound parts of the copolymer blocks at low pH caused an intensive micellization under pH≤4:

MOPEO-*b*-PAAc
pH≤4

MOPEO-*b*-PANa
pH>4

Ag nanoparticles were obtained by a chemical reduction of silver ions from silver nitrate with an excess of sodium borohydride as a reducing agent in the alkaline solutions of fully deprotonated MOPEO-*b*-PANa (pH=9). Formation of Ag nanoparticles and nanoclusters in the aqueous solutions of the copolymers was characterized using UV-Vis spectroscopy. The absorption maximum near 400 nm is known to characterize the surface plasmon absorbance of the silver nanoparticle colloid dispersions. The reaction produced intense colored, highly stable Ag nanoparticle dispersions (5-10 nm) with the sharp absorption band at 408 nm, which were formed in the MOPEO-*b*-PANa/$AgNO_3$+$NaBH_4$ reaction mixtures at the molar correlations $[Ag^+]/[PANa]=0.01$ -0.04 and $[NaBH_4]/[Ag^+]=8$ – 80. The formation of Ag nanoparticles in the micelles of the protonated MOPEO-*b*-PAAc (pH=3) under $[NaBH_4]/[Ag^+]=8$ was shown. Under $[NaBH_4]/[Ag^+]=80$ the solution pH of the MOPEO-*b*-PAAc/$AgNO_3$+$NaBH_4$ reaction mixtures increased up to 6, that caused the destruction of the micellar phase of the copolymer. In this case it was shown the partial reduction of Ag^+ to the Ag_4^{2+} nanoclusters and their further stabilization by partially protonated MOPEO-*b*-PAAc in water medium. UV-Vis spectra of these reaction mixtures content the absorption band at the λ~800 nm, which could be attributed to the so-called “blue silver”. Kinetics and optical properties of the obtained nanoparticle and nanocluster dispersions, stabilized by MOPEO-*b*-PANa and MOPEO-*b*-PAAc matrices, are discussed.

References:

1. *M. Veerapandian, K. Yun.* // Synthesis of Silver Nanoclusters and Functionalization with Glucosamine for Glyconanoparticles - Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry, 2010, 40, P.56–64,
2. *S. Kittler, C. Greulich, M.Köller, M. Epple.* // Synthesis of PVP-coated silver nanoparticles and their biological activity towards human mesenchymal stem cells - Mat.-wiss. u. Werkstofftech., 2009, 40, № 4, P. 258-264.
3. *M.V. Varghese, R. S. Dhumal, S. S. Patil, A. R. Paradkar, P. K. Khanna* // Synthesis and In-Vitro Antimycobacterial Studies of Cysteine Capped silver Nano-Particles - Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry, 2009, 39, P.554–558.

СИНТЕЗ И ФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬЧЕТВЕРТИЧНЫХ АММОНИЕВЫХ СОЛЕЙ 1,3,7-ЗАМЕЩЕННЫХ ДИБЕНЗОТИОФЕН-5,5-ДИОНОВ

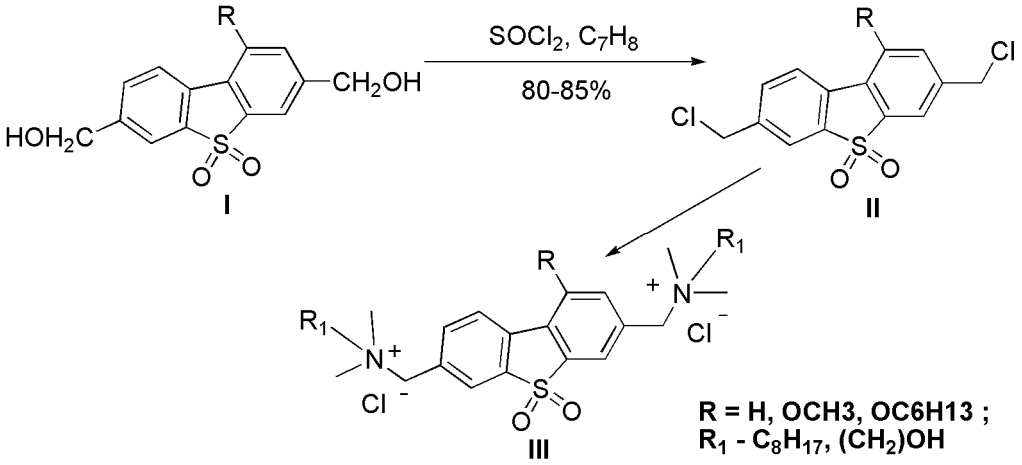
[1]Петушок В.Г., [1]Калечиц Г.В., [2]Желдакова Р.А., [1]Ольховик В.К.

[1]ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси», Минск, Беларусь
e-mail: slavol@ichnm.basnet.by
[2]Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Появление и широкое распространение штаммов микроорганизмов, обладающих устойчивостью по отношению к широко применяемым биоцидным препаратам, обусловливает 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 бактерицидных и фунгицидных средств.

Целью настоящей работы была разработка методов синтеза и поиск новых ЧАС, содержащих в молекуле дибензотиофеновый структурный фрагмент и обладающих антимикробной активностью.

Синтез четвертичных аммониевых солей на основе производных 5,5-диоксодибензотиофена, имеющих дополнительные функциональные группы в положении 1, проводили по приведенной ниже схеме кватернизацией диметилалкиламинов 3,7-бис(хлорметил)дибензотиофен-5,5-дионами **(II)**. Последние были получены из 3,7-бис(гидроксиметил)дибензотиофен-5,5-дионов **(I)**, синтез которых описан в работе авторов [2], кипячением в чистом тионил хлориде или толуоле в присутствии 2-х молярного избытка тионил хлорида. Кватернизация N,N-диметилоктиламина и N,N-диметиламиноэтанола проводилась кипячением избытка амина с дихлоридом **(II)** в ацетонитриле, выход четвертичных аммониевых солей **(III)** составлял 90-95%.



Строение полученных соединений подтверждено данными ЯМР ^{1}H и ИК спектров. Чистота синтезированных соединений составила 98±1%.

Фунгицидная активность синтезированных соединений (**III**) по отношению к 8 штаммам фитопатогенных грибов (*Alternaria alternata, Aspergillus niger, Botrytis cineria, Fusarium oxysporum, Monilia sp., Mucor sp., Penicillum lividum, Sclerotinia sclerotiorum)* была исследована по методике [3].

Степень ингибирования роста мицелия находилась в интервале 20-100% при использовании водных растворов ЧАС в конечной концентрации 100 мкг/мл. Четвертичные аммониевые соли на основе незамещенных (R=H) производных дибензотиофен-5,5-дионов показали наивысшую (сравнимую с нистатином) для этой группы соединений активность (RF=65-100% для всех исследованных штаммов грибов).

Литература:

1. *Красильников А.П.* Справочник по антисептике. Минск: Высшая школа. 1995. 367 с.
2. *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.
3. *Андреева Е.И., Картомышева В.Г.* Методические рекомендации по испытанию химических веществ на фунгицидную активность. Черкассы.1990. 63 с.

SYNTHESIS AND FUNGICIDAL ACTIVITY OF QUATERNARY AMMONIUM SALTS OF 1,3,7-SUBSTITUTED DIBENZOTHIOPHENE-5,5-DIONES

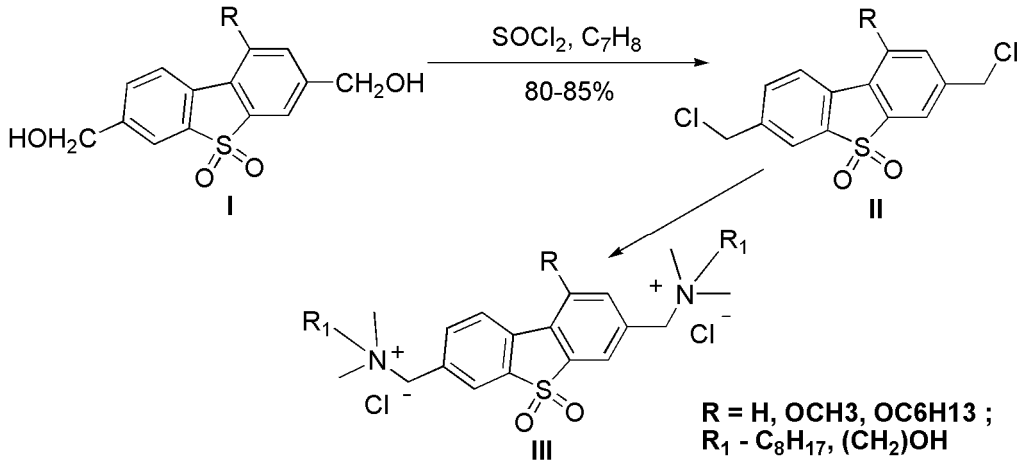
[1]Petushok V.G., [1]Kalechyts G.V., [2]Zheldakova R.A., [1]Olkhovik V.K.

[1]Institute of Chemistry of New Materials NAS of Belarus, Minsk, Belarus, e-mail: slavol@ichnm.basnet.by
[2]Belarusion State University Minsk, Belarus.

The phenomenon of bacterial resistance against of the commonly used biocide preparations stimulates a continuous search of new and new anti-infective chemicals [1]. Quaternary ammonium salts (QAS) still have a great potential as high effective, non-toxic, non-aggressive bactericidal and fungicidal agents.

The goal of this research work was a search and elaboration of methods of synthesis of new quaternary ammonium salts with high fungicidal activity on the basis of dibenzothiophene derivatives.

The quaternary ammonium salts QAS having dibenzothiophene-5,5-dione scaffold with substituents at C1, C3 and C7 positions were synthesized as depicted in the scheme below by the quaternization of dimethylalkylamines with 3,7′-bis(chloromethyl)dibenzothiophene-5,5-diones **(II)**. The above-mentioned dichlorides were obtained from 3,7′-bis(hydroxymethyl)dibenzothiophene-5,5-diones **(I)** with refluxing in thionyl chloride or mixture of toluene and 2 molar excess of thionyl chloride. Synthesis of diols **(I)** starting from dimethyl ester of biphenyl-4,4'-dicarboxylic acid was described in author's work [2]. Refluxing compounds **(II)** with excess of N,N-dimethyloctylamine and dimethylaminoethanol in acetonitrile gave the corresponding quaternary ammonium salts **(III)** in 90-95% yields.



The fungicidal activity of the synthesized compounds **(III)** was studied against 8 strains of phytopathogenic fungi (*Alternaria alternata, Aspergillus niger, Botrytis cineria, Fusarium oxysporum, Monilia sp., Mucor sp., Penicillum lividum, Sclerotinia sclerotiorum)* using method described in [3].

The laboratory tests showed that the degrees of inhibition of mycelium growth (RF, %) lay in range 20-100% when the water solutions of QAS of concentration 100 mcg/ml were used. It was found the quaternary ammonia salts on the basis of not substituted (R=H) derivatives of dibenzothiophene-5,5-dione **(III)** showed the greatest activity (comparable with nystatin) for this group of compounds (RF=65-100% for all strains of fungi).

References:

1. *Krasilnikov A.P.* Spravochnik po antiseptike. r. Minsk, Visshaya shkola. 1995. 367 c.
2. *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.
3. *Andreeva E.I., Kartomisheva V.G. Cherkassi,* Methodical recommendations on testing chemicals for fungicidal activity. 1990. 63 pp.

ПОРИСТЫЙ КРЕМНИЙ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

[1]Пивоваренко Ю.В., [1]Васильев А.Н., [2]Шевченко В.Б., [1,2]Макара В.А.

[1]УНЦ «Физико-химическое материаловедение» Киевского национального университета им. Тараса Шевченко и НАН Украины, Киев, Украина
[2]Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, Киев, Украина
e-mail: shevchenko@univ.kiev.ua

При освещении светом с длиной волны 337 нм пористый кремний (ПК) люминесцирует в красной области спектра. Интенсивность фотолюминесценции (ФЛ) ПК коррелирует со степенью его окисления активными формами кислорода (АФК). Существование такой корреляции позволяет использовать ПК для определения способности веществ различной природы индуцировать образование АФК в водных растворах.

Например, изучение ФЛ ПК, модифицированного водными растворами нуклеиновых кислот (рис. 1, спектры 2,3) позволило установить, что в растворах ДНК химическая активность кислорода выше чем в растворах РНК.

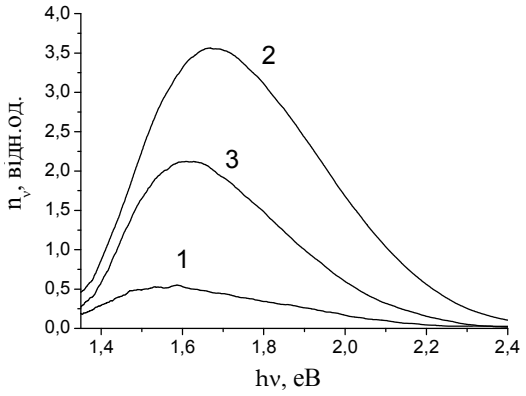


Рис. 1. Спектры фотолюминесценции (ФЛ):
1 – не модифицированный ПК;
2 – ПК, модифицированный водным раствором ДНК;
3 – ПК, модифицированный водным раствором РНК.

Изучение спектров ФЛ ПК, модифицированного водными растворами таких седативных средств как димедрол и изадрин, показало, что эти препараты стимулируют интенсивное образование АФК (рис. 2, слева). Изучение ФЛ ПК, модифицированного липидным монослоем, сформированным на поверхности водных растворов димедрола и изадрина, позволило установить, что водные растворы димедрола и изадрина инициируют образование продуктов перекисного окисления липидов, одной из разновидностей АФК (рис. 2, справа). Эти результаты позволили объяснить седативное действие димедрола и изадрина тем, что в их присутствии происходит окисление мембранных липидов и, как следствие - падением мембранных потенциалов, вызванное уменьшением электрического сопротивления мембран.

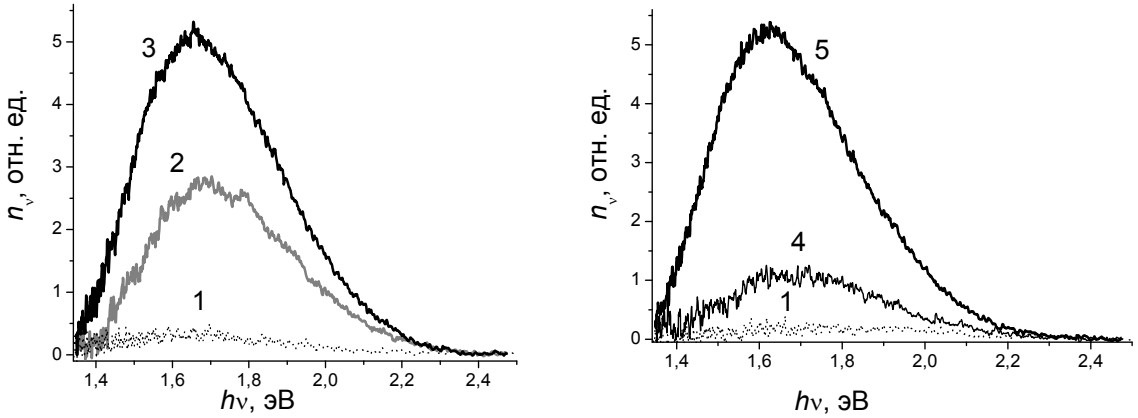


Рис. 2. Спектры ФЛ ПК. Слева: 1 – не модифицированного; 2 – модифицированного димедролом; 3 – модифицированного изадрином; Справа: 1 – не модифицированного;4 - модифицированного монослоем липида, сформированного на поверхности водного раствора изадрина (через 5 часов); 5 - модифицированного монослоем липида, сформированного на поверхности водного раствора изадрина (через 100 часов).

POROUS SILICON FOR BIOLOGICAL RESEARCHES

[1]Pyvovarenko Yu.V., [1]Vasiliev O.M., [2]Shevchenko V.B.,.[1,2]Makara V.A.

[1]The STC "Physical and Chemical Material Science" of Kyiv Taras Shevchenko National University and NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
[2]Kyiv Taras Shevchenko National University, Kyiv, Ukraine
e-mail shevchenko@univ.kiev.ua

It is known, that porous silicon (PS) luminesces in visible range of spectrum under illumination with λ_{ex}=337nm. The photoluminescence (PL) intensity correlates with its oxidation degree with reactive oxygen species. Existence of such correlation lets use PS for estimation of different substances ability to induce reactive oxygen species formation in water solutions.

For example, it has been determined in our work that oxygen chemical activity in DNA solutions is higher than that in RNA solutions (Fig 1).

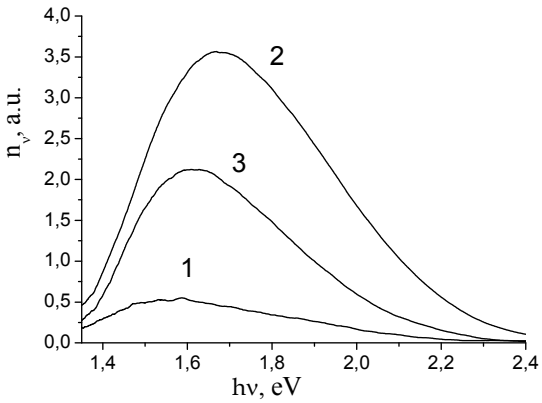


Fig. 1. PL spectra of PS:
1 – PS before treatment;
2 – PS modified with DNA solution;
3 – PS modified with RNA solution.

The study of PL spectra of PS modified with sedative substances such as Benadryl and Izadrin has shown that these preparations stimulate intensive reactive oxygen species formation (Fig 2, left). Also PL spectra of PS modified with lipid monolayer which was formed on Benadryl or Izadrin water solutions surface were measured (Fig 2, right). Our results have shown that Benadryl and Izadrin water solutions initiate formation of products of lipid peroxidation which are one of reactive oxygen species. It let explain Benadryl and Izadrin sedative effect with that fact that membrane lipid oxidation occurs in their presence. As a result membrane potential fall generated by decreasing of membrane resistance occurs.

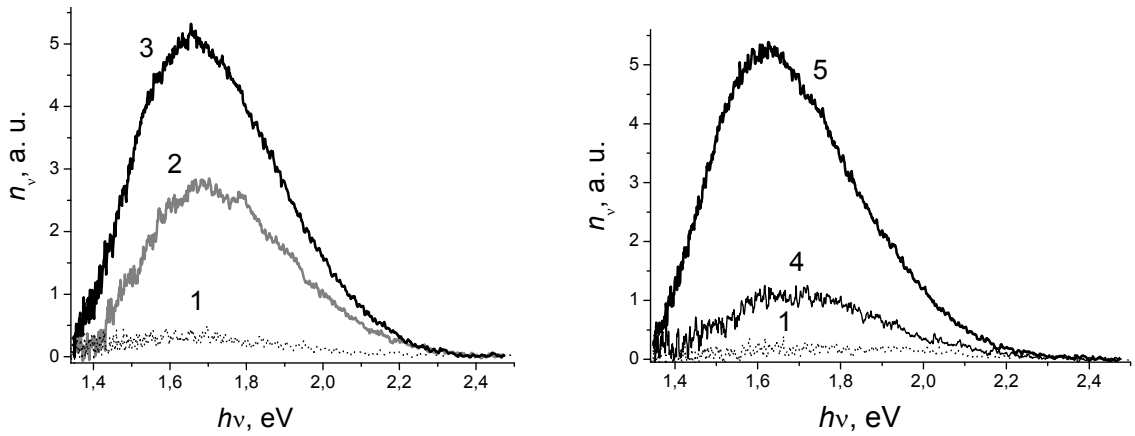


Fig. 2. PL spectra of PS: Left: 1 – PS before treatment; 2 – PS modified with Benadryl; 3 – PS modified with Izadrin. Right: – PS before treatment; 4 – PS modified with lipid monolayer which was formed on Izadrin water solutions surface (after 5 hours); 5 – PS modified with lipid monolayer which was formed on Izadrin water solutions surface (after 100 hours).

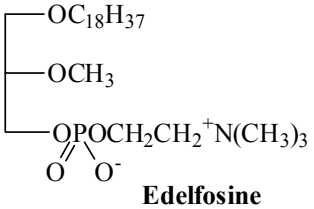
СИНТЕЗ ФЛУОРЕСЦЕНТНОМЕЧЕНОГО КАТИОННОГО ГЛИЦЕРОЛИПИДА АЛКИЛЬНОГО ТИПА

Плявник Н.В., Плетнева М.В., Серебренникова Г.А.

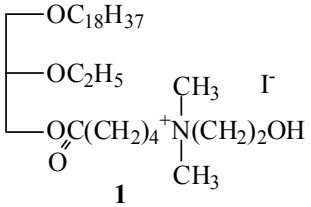
Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
e-mail: nplyavnik@mail.ru

Модифицированные глицеролипиды алкильного типа являются предметом интенсивных исследований. Повышенное внимание к этим соединениям обусловлено их высокой биологической активностью, в частности, многие из них проявляют сильные противоопухолевые свойства. Одним из наиболее изученных соединений этого класса является эдельфозин (edelfosine, 1-октадецил-2-метил-*rac*-глицеро-3-фосфохолин, ET-18-OMe), который ингибирует рост и пролиферацию различных опухолевых клеток *in vivo* и *in vitro*. Несмотря на многочисленные исследования, механизм антинеопластического действия алкильных глицеролипидов до конца не изучен, однако известно, что они действуют по нескольким направлениям, влияя на состояние клеточной мембраны, на работу многих ферментов, вызывая апоптоз клеток.

В последние годы резко возрос интерес к бесфосфорным катионным глицеролипидам с простой эфирной связью (аналогам эдельфозина), что обусловлено их высокой противоопухолевой активностью, сравнимой с активностью фосфорсодержащих соединений. Предполагается, что они действуют по тому же механизму, что и фосфолипиды. В связи с этим актуальной задачей является получение флуоресцентномеченого аналога, позволяющего проследить динамику накопления липида в клетке и его распределение во внутриклеточных компартментах.



Edelfosine

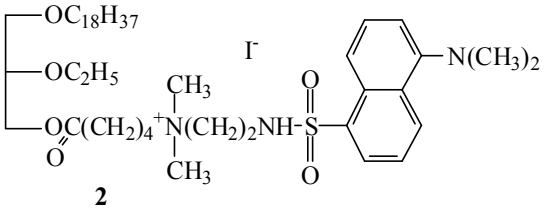


1

В результате проведенных ранее исследований нами был синтезирован бесфосфорный *rac*-*N*-{5-[(3-октадецилокси-2-этилокси)проп-1-ил]оксипентаноил}-*N,N*-диметил-*N*-(2-оксиэтил)аммонийиодид **(1)**, противоопухолевая активность которого в опытах *in vitro* сравнима с активностью эдельфозина. Наличие реакционноспобной функциональной группы в полярном домене данного липида позволяет, путем введения дансильной метки, превратить его в перспективный флуоресцентный зонд. Однако, наличие четвертичного атома азота в непосредственной близости от функциональной группы значительно снижает реакционную способность последней. В связи с этим была выбрана блочная стратегия синтеза – сначала осуществили присоединение дансильной группы к амину, а затем ввели флуоресцентномеченую полярную головку в молекулу глицеролипида. В качестве амина, формирующего катионный домен липидной молекулы, использовали 2-диметиламиноэтиламин, содержащий более активную аминогруппу.

Дансилирование выбранного амина проводили в среде безводного ацетона в присутствии триэтиламина. После хроматографической очистки на силикагеле выход продукта составил 72%. Последующая кватернизация синтезированного третичного амина *rac*-1-октадецил-2-этил-3-(5-бромпентаноил)глицерином в присутствии NaI привела к образованию целевого флуоресцентномеченого глицеролипида **(2)** с выходом 42%.

Структура полученных соединений была подтверждена данными ^{1}H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.



2

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 07-03-00632-а) и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009 - 2013 г» (Госконтракт № П 1340).

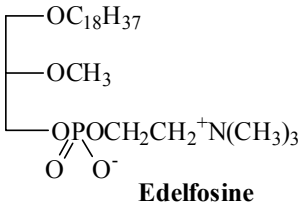
SYNTHESIS OF FLUORESCENT CATIONIC ETHER GLYCERLIPID

Plyavnik N.V., Pletneva M.V., Serebrennikova G.A.

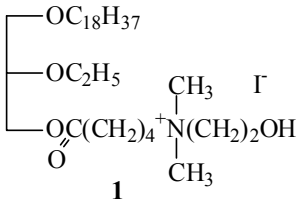
M.V. Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia
e-mail: nplyavnik@mail.ru

Modified alkyl glycerolipids are the subject of intense research. Increased attention to these compounds due to their high biological activity, in particular, many of them show strong anticancer properties. One of the most studied compounds of this class is edelfosine (1-octadecyl-2-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine, ET-18-OMe), which inhibits the growth and proliferation of various tumor cells *in vivo* and *in vitro*. Despite numerous studies, the mechanism of antineoplastic action of ether glycerolipids is not fully understood, but it is known that they act in several ways, absorbing into cell membrane, affecting the work of many enzymes, causing cell apoptosis.

Recent years have increased interest in non-phosphorus cationic ether glycerolipids (analogues edelfosine) due to their high antitumor activity, comparable to the activity of phosphorus-containing alkyl lipids. It is assumed that they operate on the same mechanism as the phospholipids. Because it is necessary to obtain a fluorescent analog, which allows you to track the dynamics of accumulation of lipid in the cell and its distribution in intracellular compartments.



Edelfosine



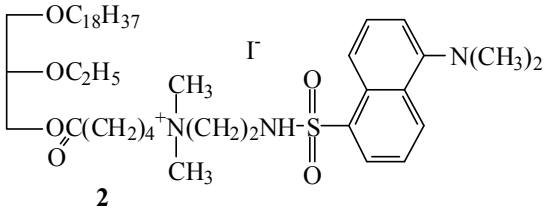
1

As a result of earlier studies, we have synthesized non-phosphorus *rac-N*-{5-[(3-octadecyloxy-2-ethoxy) prop-1-yl]oxypentanoyl}-*N,N*-dimethyl-*N*-(2-hydroxyethyl)ammonium iodid **(1)**, with antineoplastic activity in experiments *in vitro* is comparable to the activity of edelfosine. Reactivity functional group in the polar domain of the lipid allows to obtain a promising fluorescent analogue for the selective labeling of cancer cells. However, the presence of quaternary nitrogen nearly the functional group reduces the reactivity of OH-group. In this regard, was chosen to block synthesis strategy - first realized to addition dansil group to the amine, and then entered fluorescent polar head to the glycerolipid molecule. As an amine, forming a cationic domain of the lipid, we have used 2-dimethylaminoethylamine, which contains more active NH_2-group.

Reaction of dansyl chloride with selected amine in an anhydrous acetone to presence of triethylamine gave fluorescent amine. After chromatographic purification on a silica gel yield was 72%.

Subsequent quaternization of synthesized tertiary amine with *rac*-1-octadecyl-2-ethyl-3-(5-bromopentanoyl)glycerol to presence of NaI led to the target fluorescent glycerolipids **(2)** with 42% yield.

^{1}H NMR spectroscopic and mass spectroscopic data agree with the structures of the compounds obtained.



2

Work is supported by Federal Program «Scientific and pedagogical human resources for innovative Russia 2009-2013» (the state contract № P1340) and the Russian Foundation for Basic Research (№ 10-03-00995-a).

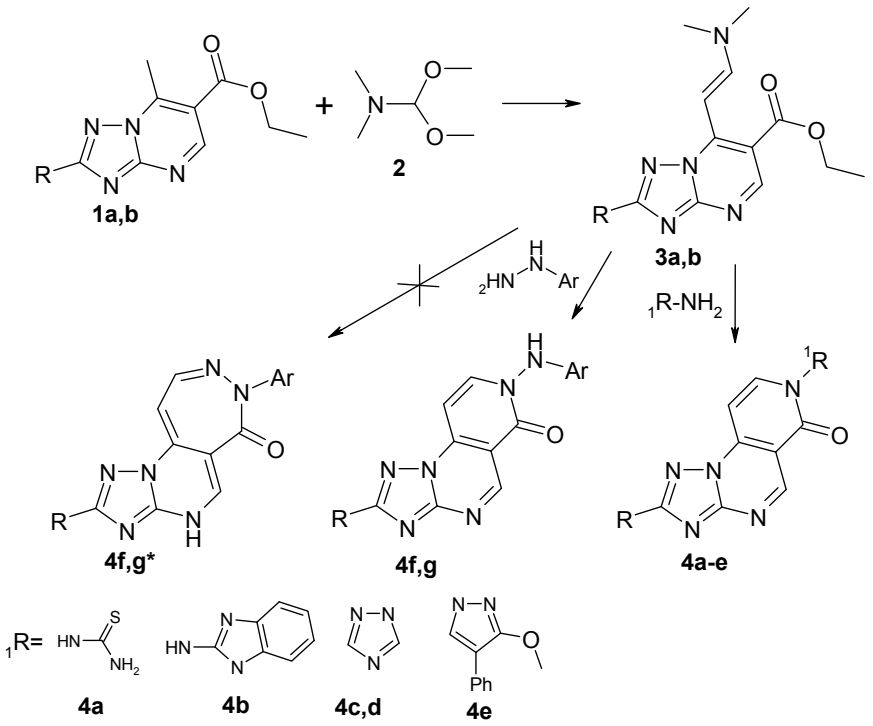
ПОСТРОЕНИЕ ПИРИДИНОВОГО ЦИКЛА НА 7-МЕТИЛ-6-ЭТОКСИКАРБОНИЛ-[1,2,4]ТРИАЗОЛО[1,5-А]ПИРИМИДИНАХ ЦИКЛИЗАЦИЕЙ С ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ АМИНАМИ

Полухин Е.Л., Потапов А.Ю., Шихалиев Х.С.

Воронежский государственный университет, Воронеж, Российская Федерация
e-mail: chocd261@chem.vsu.ru

Многие производные пиридонов находят применение в медицине: бромид пиридогистамина [3-(диметилкарбамоилокси)-1-метилпиридинийбромид] - антихолинэстеразное средство; 3-оксипиридин - структурный фрагмент витамина группы B_6; эмоксипин (гидрохлорид 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина) - водорастворимый антиоксидант-мембранопротектор - применяется в неврологии и психиатрии; 5-иод- и N-ацетил-5-иод-2-пиридоны - рентгеноконтрастные препараты. К производным 2-оксипиридина относится алкалоид рицин; к N-аминокислотным производным 3,4-дигидроксипиридина-алкалоид мимозин. Известная ранее методология аннелирования пиридинового цикла для производных пиразолопиримидина[1] успешно реализованная на 7-метил-6-этоксикарбонил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидинах[2] нами распространена на полифункциональные амины, такие как тиосемикарбазид, 2-бензимидазолилгидразин, 3-амино-[1,2,4]триазол, 5-метокси-4-фенил-3-амино-пиразол, арилгидразины (схема 1)

Схема 1



R=H **(1a, 3a, 4a-c, 4e-g)**, CH_3 **(1b, 3b,4d)**

Ar=Ph **(4f)**, 4Cl-Ph **(4g)**

Циклизацию (E)-7-(2-диметиламино-1-винил)-6-этоксикарбонил[1,2,4,]триазоло[1,5-а]пиримидинов проводят в ледяной уксусной кислоте. Применение данного растворителя дает максимально возможные выходы 6,7-дигидропиридо[3,4-е][1,2,4]триазоло[1,5-а]-пиримидин-6-онов **4a-g** за счет связывания диметиламина. При использовании в качестве нуклеофила арилгидразинов примесь аннелированных диазепинонов **4f,g*** в реакционной массе отсутствует ввиду влияния арильного фрагмента.

Литература:

1.*F. Bruni, S. Chimichi, B. Cosimelli, A. Costanzo, S. Selleri,* Heterocycles, 1990,31,1141.
2.*Х.С. Шихалиев, А.Ю. Потапов, Е.Л. Полухин, А.И. Сливкин.* Аннелирование пиримидинового цикла к вицинальным метилэтоксикарбонилпиримидинам. // Известия Академии наук. Серия химическая, 2009, № 9.

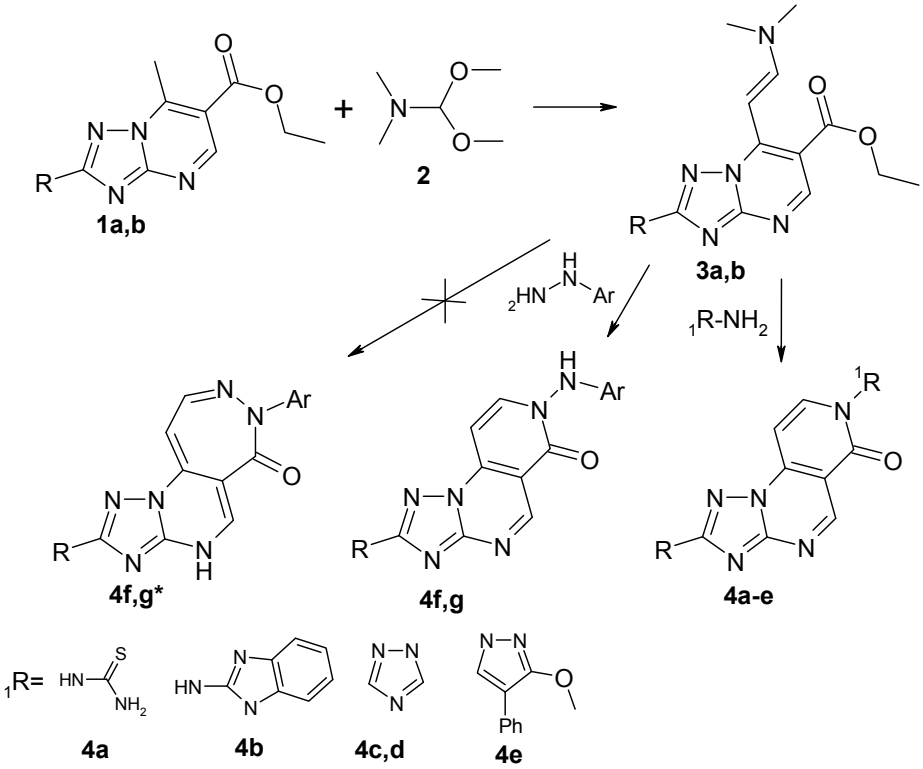
THE CONSTRUCTION OF THE PYRIDINE RING OF 7-METHYL-6-ETHOXYCARBONYL-[1,2,4] TRIAZOLO [1,5-A] PYRIMIDINE CYCLIZATION WITH POLYFUNCTIONAL AMINES

Polukhin E.L., Potapov A.U., Shikhaliev X.S.

Voronezh State University, Voronezh, Russia
e-mail: chocd261@chem.vsu.ru

Many pyridones derivatives are used in medicine: piridogistamine bromide [3 - (dimetilkarbamoiloxy)-1-metilpiridinilbromid] - anticholinesterases; 3-hydroxypyridine - structural fragment of vitamin B6; emoxypin (hydrochloride 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine) - water-soluble antioxidant-membrane protectors - used in neurology and psychiatry, 5-iodo-and N-acetyl-5-iodo-2-pyridones - radiopaque drugs. Derivative of 2-hydroxypyridine is an alkaloid ricin, to the N-amino acid derivatives of 3,4-digidroxypyridine-alkaloid mimozin. Formerly known methodology of annelation of pyridine cycle for derivatives pirazolopirimidine[1] successfully implemented on the 7-methyl-6-ethoxycarbonyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidine[2] we extended to polyfunctional amines, such as thiosemicarbazide, 2-benzimidazolilgidrazin, 3-amino-[1,2,4]triazole, 5-methoxy-4-phenyl-3-amino-pyrazole, aryl hydrazine (Scheme 1).

Scheme 1



R=H **(1a, 3a, 4a-c, 4e-g)**, CH_3 **(1b, 3b,4d)**

Ar=Ph **(4f)**, 4Cl-Ph **(4g)**

Cyclization of (E)-7-(2-dimethylamino-1-vinyl)-6-ethoxycarbonyl[1,2,4,]triazolo[1,5-a]pyrimidine is carried out in glacial acetic acid. Application of the solvent gives the highest possible yields of 6,7-digidropirido[3,4-e]1,2,4]triazolo[1,5-a]-pyrimidin-6-ones **4a-g** by binding dimethylamine. When used as an admixture of annelated aryl hydrazine nucleophile diazepinones **4f,g*** in the reaction mass is not due to the influence of the aryl fragment.

References:

1.*F. Bruni, S. Chimichi, B. Cosimelli, A. Costanzo, S. Selleri,* Heterocycles, 1990,31,1141.

X. S. Shikhaliev, A.U. Potapov, E.L. Polukhin, A.I. Slivkin. Annelation of the pyrimidine cycle to vicinal methylethoxycarbonylpyrimidines. Proceedingsthe Academy of of Sciences. Chemical Bulletin, 2009, № 9.

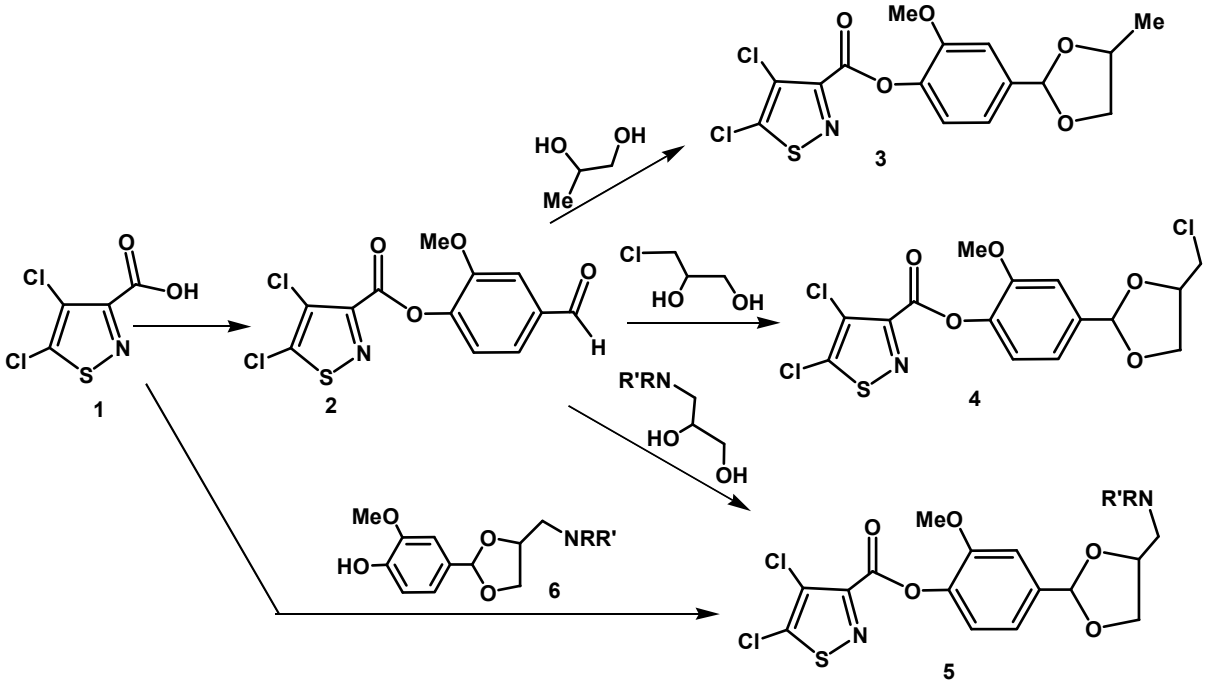
СИНТЕЗ НОВЫХ ПОТЕНЦИРУЮЩИХ АГЕНТОВ ИНСЕКТИЦИДОВ И ФУНГИЦИДОВ

[1]Поткин В.И., [1]Зубенко Ю.С., [1]Дикусар Е.А., [1]Зверева Т.Д., [1]Клецков А.В., [2]Золотарь Р.М., [2]Чепик О.П.

[1]Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: potkin@ifoch.bas-net.by
[2] Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Интерес к производным изотиазола постоянно растет, что объясняется широким спектром биологической активности изотиазолов и их способностью проявлять синергетический эффект в комбинациях с биоактивными соединениями [1]. Ранее нами было установлено, что 4,5-дихлоризотиазол-3-карбоновая кислота (**1**) и ее ванилиновый эфир (**2**) потенцируют действие пиретроидного инсектицида Витан в отношении имаго и личинок колорадского жука. Трансформация альдегидной группы ванилинового остатка в азометиновую и аминную приводит к появлению существенного потенцирующего действия в композиции с неоникотиноидным инсектицидом имидаклопридом (Кербер) [2]. С другой стороны, известно, что соединения, содержащие замещенный диоксолановый фрагмент, например, Спироксамин, используются в современных пестицидных композициях.

Мы разработали подходы к синтезу изотиазольных производных ванилина, содержащих диоксолановый фрагмент, на основе доступного эфира 4,5-дихлоризотиазол-3-карбоновой кислоты (**2**). Реакцией по альдегидной группе с 1,2-пропиленгликолем был сформирован метилзамещенный диоксолановый гетероцикл (**3**). Реакция с 3-хлорпропиленгликолем приводит к производному с хлорметильной группой в диоксолановом остатке (**4**). Синтез соединений (**3**) и (**4**) проводили в условиях катализа сульфокатионитом Фибан. Показано, что построение диоксоланового фрагмента, содержащего аминофункцию (**5**), можно осуществлять по реакции эфира (**2**) с соответствующим аминопропиленгликолем или этерификацией предварительно синтезированного производного ванилина (**6**). Второй путь представляется предпочтительным.



Синтезированные соединения проходят исследования в качестве фунгицидов в отношении фитопатогенных грибов и потенцирующих агентов в композициях с инсектицидами в отношении личинок колорадского жука.

Литература:

1. Chemistry of Biologically Active Isothiazoles / F. Clerici ·[et al.] // Topics in Heterocyclic Chemistry, vol.9 / Ed. R. R. Gupta. – Springer, 2007, p. 179-264.
2. *V. Potkin , Yu. Zubenko, A. Bykhovetz, R. Zolotar, V. Goncharuk.* // Synthesis of Novel Vanillin Derivatives Containing Isothiazole Moieties and its Synergistic Effect in Mixtures with Insecticides - Natural Product Communications – 2009, vol. 4, N 9, p. 1205-1208.

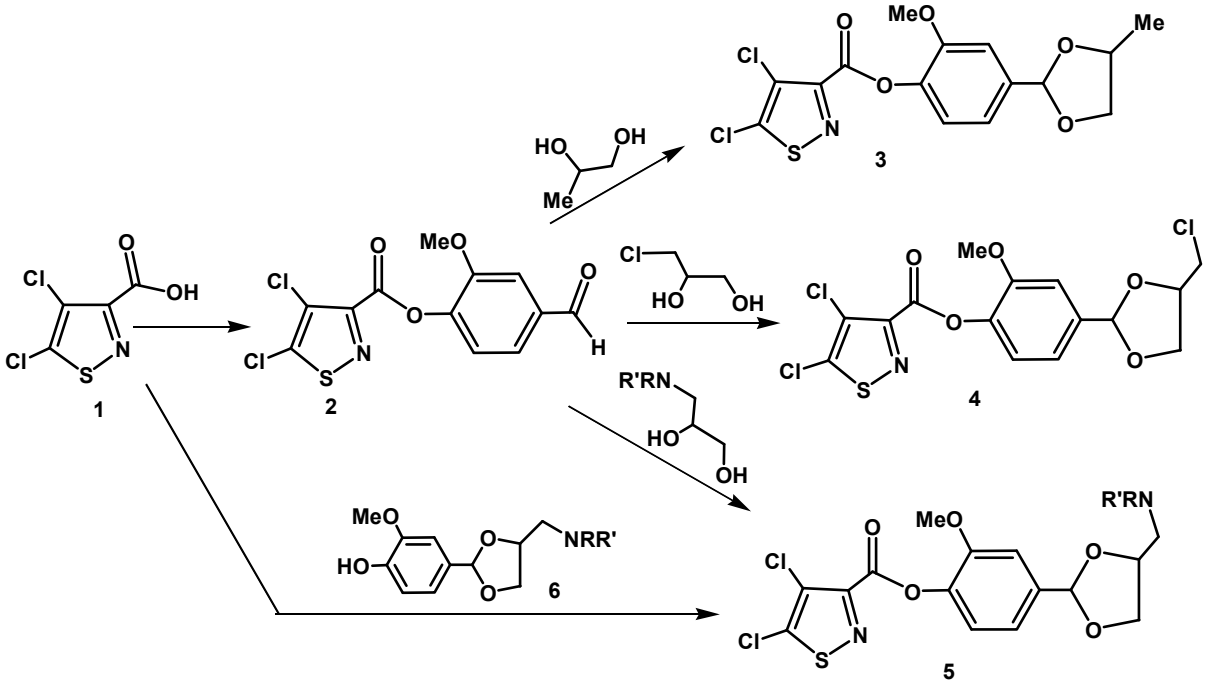
SYNTHESIS OF NEW POTENTIATING AGENTS FOR INSECTICIDES AND FUNGICIDES

[1]Potkin V.I., [1]Zubenko Y.S., [1]Dikusar E.A., [1]Zvereva T.D., [1]Kletskov F.V., [2]Zolotar R.M., [2]Chepik O.P.

[1] Institute of Physical Organic Chemistry, NAS of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: potkin@ifoch.bas-net.by
[2] Institute of Bioorganic Chemistry of NAS of Belarus, Minsk, Belarus

The interest in the isothiazole derivatives is constantly growing, due to a wide spectrum of biological activity of isothiazoles and their ability to show a synergistic effect in combination with bioactive compounds [1]. Previously, we found that 4,5-dihlorisothiazol-3-carboxylic acid (**1**) and its vanillin ether (**2**) potentiate the action of pyretroid insecticide Vitan against imago and larvae of Colorado potato beetle. Transformation of the aldehyde group in vanillin remainder into the azomethine and amino ones leads to a significant potentiating action in combination with neonicotinoide insecticide imidacloprid (Kerber) [2]. On the other hand, it is known that compounds containing a substituted dioxolane fragment, for example, Spiroxamine are used in modern pesticide formulations.

We have developed approaches to the synthesis of isothiazole vanillin derivatives containing dioxolane fragment, on the basis of the available ester of 4,5-dihlorisothiazol-3-carboxylic acid (**2**). The methyl-substituted dioxolane heterocycle (**3**) was formed by reaction with 1,2-propylene glycol on the aldehyde group. Reaction with 3-cloroporopilene glycol leads to the derivatives with cloromethyl group in dioxolane residue (**4**). Synthesis of compounds (**3**) and (**4**) were carried out under conditions of acid catalysis. It was shown that the the construction of dioxolane fragment containing amino funtion (**5**), can be carried out by the reaction of ester (**2**) with the corresponding amino propylene glycol or by the esterification of pre-synthesized vanillin derivative (**6**). The second way is preferable.



The compounds synthesized are testing as fungicides against phytopathogenic fungi and as potentiating agents in the compositions with insecticides for Colorado potato beetle larvae.

References:

1. Chemistry of Biologically Active Isothiazoles / F. Clerici ·[et al.] // Topics in Heterocyclic Chemistry, vol.9 / Ed. R. R. Gupta. – Springer, 2007, p. 179-264.
2. *V. Potkin , Yu. Zubenko, A. Bykhovetz, R. Zolotar, V. Goncharuk* // Synthesis of Novel Vanillin Derivatives Containing Isothiazole Moieties and its Synergistic Effect in Mixtures with Insecticides - Natural Product Communications – 2009, vol. 4, N 9, p. 1205-1208.

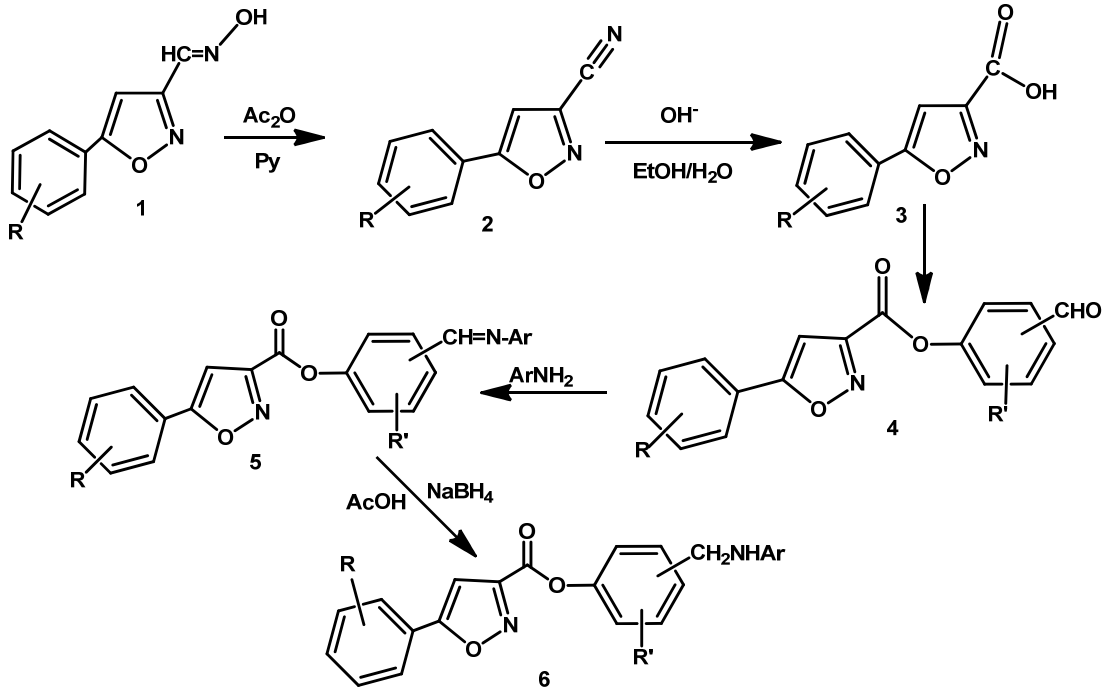
СИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ВАНИЛИНА, СОДЕРЖАЩИХ ИЗОКСАЗОЛЬНЫЙ ГЕТЕРОЦИКЛ

[1]Поткин В.И., [2]Гаджилы Р.А., [1]Петкевич С.К., [1]Дикусар Е.А., [1]Жуковская Н.А., [1]Зверева Т.Д.

[1]Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: potkin@ifoch.bas-net.by
[2] Институт полимерных материалов НАН Азербайджана, Сумгаит, Азербайджан

Ванилин и его гомологи, помимо использования в пищевой промышленности и парфюмерии, обладают высоким синтетическим потенциалом и применяются в направленном синтезе различных биоактивных продуктов. На их основе получены соединения, обладающие антимутагенной, антикластогенной, антикарциногенной, антимикробной и фунгицидной активностью. Показано, что ванилин и некоторые замещенные бензальдегиды ингибируют ДНК-протеинкиназу и регулируют репарацию поврежденной ДНК по механизму NHEJ (non-homologous DNA end-joining) [1].

Мы синтезировали ряд производных ванилина и замещенных гидроксибензальдегидов (*о*-ванилина, изованилина, этилванилина, *п*-гидроксибензальдегида), содержащих изоксазольный гетероцикл и перспективных для медико-биологического исследования. Синтез осуществляли, исходя из доступных 5-фенил(*п*-толил)-3-гидроксиимиметилизоксазолов (**1**), которые получали конденсацией 5-фенил(*п*-толил)трихлораллилкетонов с гидроксиламином. Оксимная группа соединений (**1**) была трансформирована в нитрильную и далее в карбоксильную с образованием 5-фенил(*п*-толил)изоксазол-3-карбоновых кислот (**3**). Реакцией по гидроксигруппе ванилинов и бензальдегидов были получены сложные эфиры (**4**). Взаимодействием эфиров (**4**) с ароматическими аминами по HC=O группе бензальдегидных остатков синтезированы соответствующие азометины (**5**). Действием на азометины (**5**) боргидрида натрия в уксусной кислоте азометиновая группа селективно была восстановлена в аминную, и с выходами 85-90% были получены соответствующие аминопроизводные (**6**).



R = H, 4-Me; R' = H, 6-MeO, 6-EtO; Ar = 4-Ph-Ph, 4-PhO-Ph, 4-BrPh, 4-HOOCPh, 2-HOPh;
для **4-6**: 2-CHO, 3-CHO, 4-CHO; 2-CH=NAr, 3-CH=NAr, 4-CH=NAr; 2-CH_2NHAr, 3-CH_2NHAr, 4-CH_2NHAr

Синтезированные соединения проходят медико-биологические исследования в регулировании процессов репарации поврежденных ДНК и ингибировании ферментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ и НАН Азербайджана (грант №Х10Аз-001).

Литература:

1. *S.Durant, P.Karran.* // Vanillins - a novel family of DNA-PK inhibitor - Nuclear Acids Research, 2003, vol. 31, N 19, p. 5501-5512.

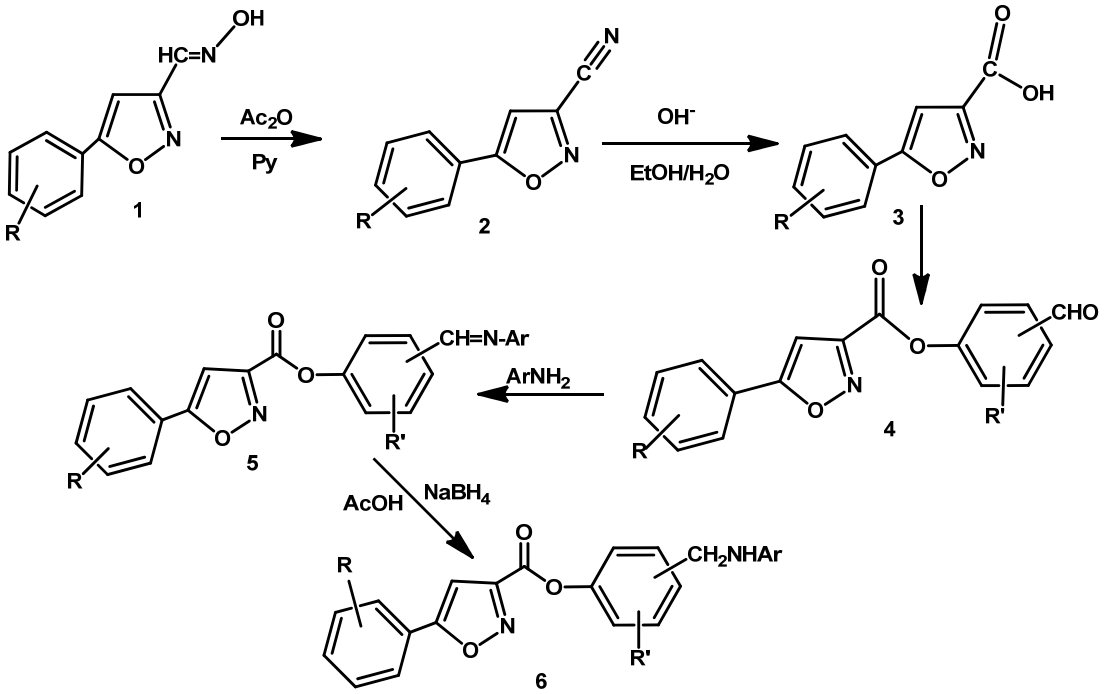
SYNTHESIS OF VANILLIN BIOLOGICALLY ACTIVE DERIVATIVES, CONTAINING ISOXAZOLE HETEROCYCLE

[1]Potkin V.I., [2]Hajili R.A., [1]Petkevich S.K., [1]Dikusar E.A., [1]Zhukovskaya N.A., [1]Zvereva T.D.

[1] Institute of Physical Organic Chemistry, NAS of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: potkin@ifoch.bas-net.by
[2] Institute of Polymer Materials of NAS of Azerbaijan, Sumgait, Azerbaijan

Vanillin and its homologues, besides using in food industry and cosmetics, have a high synthetic potential and are used in the target synthesis of various bioactive products. The compounds possessing antimutagenic, anticlastogenic, anticarcinogenic, anti-microbial and fungicidal activity were obtained on the basis of these substances. It was shown that vanillin and some substituted benzaldehydes inhibit the DNA protein kinase and regulate the repair of damaged DNA by the mechanism of NHEJ (non-homologous DNA end-joining) [1].

We synthesized series derivatives of vanillin and substituted hydroxybenzaldehydes (*o*-vanillin, isovanillin, ethylvanillin, *p*-hydroxybenzaldehyde), containing the isoxazole heterocycle and promising for biomedical research. The synthesis was carried out on the basis of the available 3-hydroxyiminomethyl-5-phenyl(*p*-tolyl)-isoxazoles (**1**), which were obtained by the condensation of 5-phenyl(*p*-tolyl)trichloroallyl ketones with hydroxylamine. Oxime group of compounds (**1**) was transformed into a nitrile one and then to carboxyl group with formation of 5-phenyl(p-tolyl)isoxazole-3-carboxylic acid (**3**). Esters (**4**) were obtained by reaction on hydroxyl group of vanillins and benzaldehydes. The corresponding azomethines (**5)** were synthesized by the interaction of aromatic amines on the HC=O group of benzaldehyde residues of esters (**4**). By sodium borohydride action on azomethines (**5)** in acetic acid the azomethine group was selectively reduced in the amine one, and corresponding amino derivatives (**6**) were obtained with 85-90% yields.



The compounds synthesized are currently undergoing biomedical research in the regulation of repair processes of damaged DNA and inhibition of enzymes.

This work was supported by BRFFR and Azerbaijan Academy of Sciences (project NX10Az-001).

References:*S. Durant, P. Karran* // Vanillins - a novel family of DNA-PK inhibitor - Nuclear Acids Research, 2003, vol. 31, N 19, p. 5501-5512.

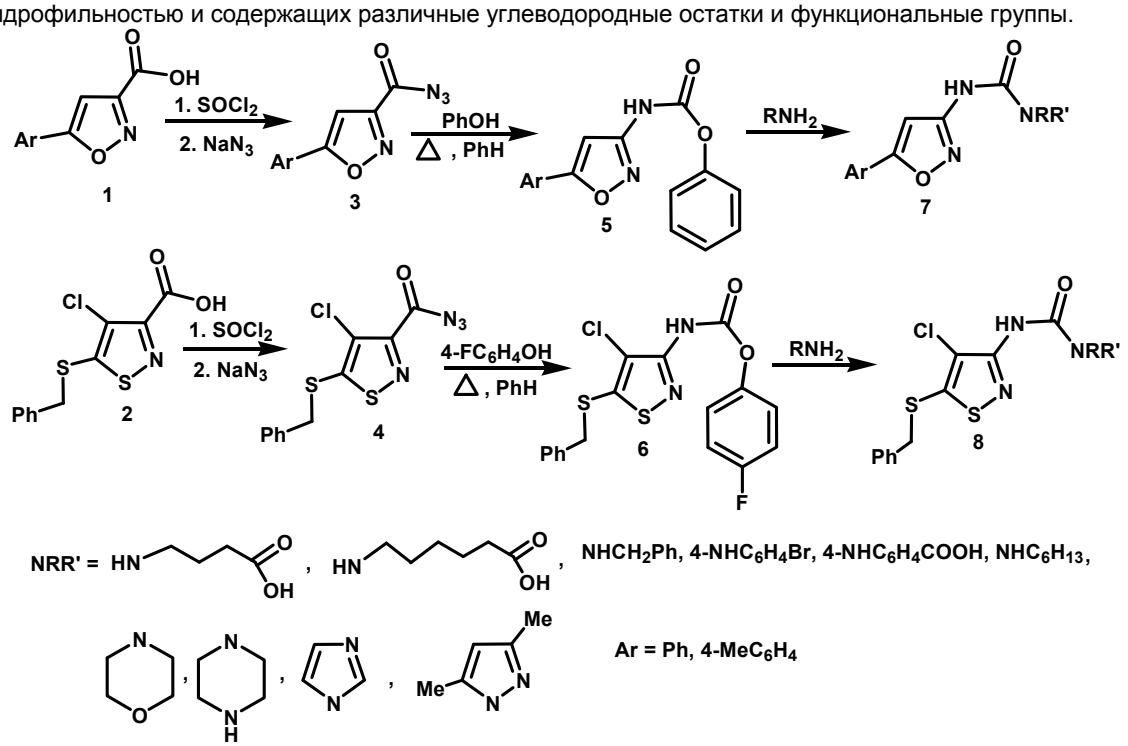
СИНТЕЗ 1,2-АЗОЛ-3-ИЛКАРБАМИДОВ – НОВЫХ АНАЛОГОВ ИНГИБИТОРОВ КИНАЗ

[1]Поткин В.И., [1]Петкевич С.К., [1]Зубенко Ю.С., [1]Клецков А.В., [2]Казбанов В.В., [2]Гуринович Т.А., [2]Лопатина Л.А., [2]Чернов А.Н., [2]Талабаев М.В.

[1]Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: potkin@ifoch.bas-net.by
[2] Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Гетероциклы ряда изоксазола и изотиазола (типичных представителей 1,2-азолов) являются структурными фрагментами молекул широкого круга физиологически активных веществ, что обуславливает постоянно растущий интерес к исследованиям в области синтеза и изучения биологических свойств этих соединений. Изоксазольный гетероцикл входит в состав молекул цитостатических, антитуберкулезных агентов, антиконвульсантов и пестицидов. Среди производных изотиазола выявлены соединения, перспективные для лечения болезни Альцгеймера, противовоспалительные, противотромбозные и противоконвульсивные средства. Недавно было установлено, что некоторые изотиазолы являются ингибиторами киназ и могут использоваться в терапии опухолей. Например, изотиазолы с карбамидной функцией в положении 3 ингибируют рецепторы факторов роста тирозин киназы VEGFR-1 и VEGFR-2, и один из них проходит исследования в качестве противоопухолевого препарата CP-547,632 [1].

Нами разработаны методы синтеза новых 5-замещенных 1,2-тиазол-3-илкарбамидов и их гетероаналогов – 1,2-оксазол-3-илкарбамидов – изостеров известных ингибиторов тирозинкиназ, представляющих интерес для биотестирования. Исходными соединениями являются соответствующие 1,2-азол-3-карбоновые кислоты (**1**,**2**), которые последовательно превращали в азиды (**3**,**4**), уретаны (**5**,**6**) и карбамиды (**7**,**8**). В результате был получен ряд 1,2-азол-3-илкарбамидов, отличающихся липофильностью и гидрофильностью и содержащих различные углеводородные остатки и функциональные группы.



Выполнено компьютерное моделирование лиганд-белковых комплексов карбамидов (**7**,**8**) (NRR' = $NHCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$) и VEGFR-1, VEGFR-2 тирозинкиназы в рамках методов молекулярной механики с использованием программ Dock 6.4 и USF Chimera. Оценка энергетических характеристик ван-дер-ваальсового и электростатического взаимодействия указывает на возможность эффективного связывания 1,2-азольного лиганда белком.

Синтезированные соединения проходят исследования на первичной культуре глиобластомы человека и перевиваемой культуре клеток глиомы С6 в лаборатории психонейрофизиологии и онкогенеза Института физиологии НАН Беларуси.

Литература:

1.*J.S. Beebe [et al.]* // Pharmacological characterization of CP-547,632, a novel vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for cancer therapy - Cancer Research, 2003, vol. 63, N11, p. 7301-7309.

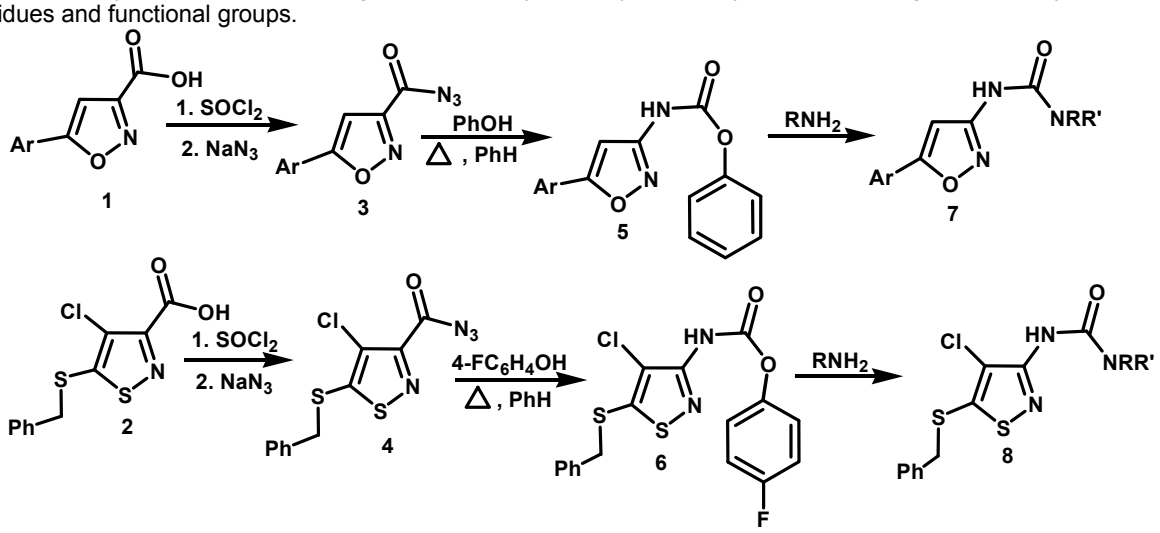
SYNTHESIS OF 1,2-AZOL-3-YLCARBAMIDES - A NEW ANALOGUES OF KINASES INHIBITORS

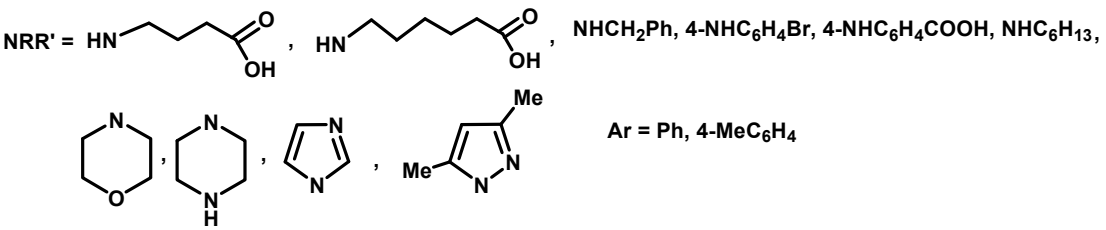
[1]Potkin V.I., [1]Petkevich S.K., [1]Zubenko Yu.S., [1]Kletskov A.V., [2]Kazbanov V.V., [2]Gurinovich T.A., [2]Lopatina L.A., [2]Chernov A.N., [2]Talabaev M.V.

[1] Institute of Physical Organic Chemistry, NAS of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: potkin@ifoch.bas-net.by
[2] Institute of Physiology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus

The heterocycles of isoxazole and isothiazol series (typical representatives of 1,2-azoles) are structural fragments of molecules of a wide range of physiologically active substances, which leads to growing interest in research of the synthesis and study of the biological properties of these compounds. Isoxazole heterocycle is the fragment of the molecules of cytostatic, antituberculosis agents, anticonvulsants and pesticides. Among the isothiazole derivatives compounds were found which are promising for the treatment of Alzheimer's disease, inflammatory, thrombolytic and anticonvulsant remedies. Recently it was found that some isothiazoles are kinases inhibitors and can be used in the tumors therapy. For example, isothiazoles with urea function in position 3 inhibit growth factor receptor VEGFR-1 and VEGFR-2 tyrosine kinase, and one of them is undergoing the study as anticancer drug CP-547,632 [1].

We have developed methods for the synthesis of new 5-substituted 1,2-thiazol-3-yl carbamides and their hetero analogues - 1,2-oxazol-3-yl carbamides - isosteres of known tyrosine kinases inhibitors which are of interest for bioassays. The corresponding 1,2-azole-3-carboxylic acid (**1**,**2**) was the starting compounds, which are consistently converted into azides (**3**,**4**), urethanes (**5**,**6**) and ureas (**7**,**8**). In result we have obtained a series of 1,2-azol-3-yl carbamides differing in lipophilicity and hydrophilicity and containing different hydrocarbon residues and functional groups.





Computer modeling of ligand-protein complexes of ureas (**7**,**8**) (NRR' = $NHCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2COOH$) and VEGF1, VEGF-2 tyrosine kinase was carried out by the methods of molecular mechanics using the program Dock 6.4 and USF Chimera. Evaluation of the energy characteristics of the van der Waals and electrostatic interaction indicates on the possibility of efficient binding of 1,2-azole ligand with protein.

The compounds synthesized are studying in primary culture of human glioblastoma cell cultures and glioma C6 in the laboratory psychoneurophysiology and carcinogenesis of the Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus.

References:

1. *J.S. Beebe [et al.]* // Pharmacological characterization of CP-547,632, a novel vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for cancer therapy - Cancer Research, 2003, vol. 63, N11, p. 7301-7309.

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ QSAR МОДЕЛИ ИНГИБИТОРОВ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 4

Прокопенко В.В., Ковалишин В.В., Чарочкина Л.Л.

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail:prokopenkov@bpci.kiev.ua

Фосфодиэстераза 4 (ФДЭ-4) регулирует уровень цАМФ и таким образом влияет на различные физиологические процессы в клетке, такие как сокращение гладких мышц дыхательных путей и сосудов, иммунный ответ лейкоцитов, включая противовоспалительное действие моноцитов, Т-клеток и нейтрофилов, *цАМФ*-стимулируемую *транскрипцию генов*, и т.п. В данный момент ФДЭ-4 вызывает значительный интерес, поскольку ее ингибиторы имеют потенциальное терапевтическое применение для лечения таких болезней как астма, остеопороз, псориаз, шизофрения, депрессия, хронические болезни легких и др. Целью данного исследования было построение работоспособных QSAR моделей, применимых для дальнейшего поиска новых потенциальных ингибиторов ФДЭ-4. Для анализа использовали выборку, состоящую из 1453 соединений, с известным значением IC_{50}, сформированную на основе данных из 72 статей. Эти данные находятся в свободном доступе на сервере OCHEM (Online Chemical Modeling Environment). OCHEM - интернет платформа, предназначенная для автоматизации и упрощение всех этапов QSAR моделирования [1]. Сервер состоит из двух главных подсистем – базы данных соединений и программного обеспечения для моделирования. Пользовательская база данных состоит из набора инструментов для быстрого ввода, поиска и модификации тысяч записей. База данных хорошо интегрирована с программами моделирования, которые поддерживают все шаги, необходимые для создания прогнозирующих моделей - поиск данных, расчет и отбор дескрипторов, применение машинных методов обучения, проверка и анализ области применения модели.

Предварительно все молекулы стандартизировали с помощью программы Chemaxon standardizer доступной на сервере OCHEM [1]. 2D координаты атомов пересчитывали заново, ионы и соли были удалены из молекулярной структуры, молекулы приводили к нейтральной форме, дубликаты удаляли. 3D структуры смоделированы с помощью программы MOPAC и сохранены в SDF формате. Молекулярные дескрипторы рассчитывали с помощью таких программ как E-State indices, Dragon и ADRIANA.Code, доступных на сервере OCHEM. Начальное количество рассчитанных дескрипторов в дальнейшем было подвергнуто сокращению. Вначале удаляли дескрипторы, имеющие постоянные значения для всех молекул, затем удаляли взаимно коррелированные дескрипторы, т.е. если коэффициент корреляции дескриптора с другими дескрипторами был равен или превышал 0.95, то он удалялся из исходной выборки. Для построения моделей исследовали различные методы машинного обучения, такие как линейный множественный регрессионный анализ (MLRA- Multiple Linear Regression Analysis), Метод опорных векторов (SVM-Support Vector machine), Ассоциативная нейронная сеть (ASNN-Associative Neural Network), метод ближайших соседей (KNN-k-Nearest Neighbors) и другие. Наилучшая модель получена с помощью ASNN метода (see Fig. 1). Точность всех индивидуальных моделей оценивалась с помощью метода 5-разовой перекрестной проверки. Полученные Q^2 коэффициенты находились в диапазоне 0.65-072. Область применения моделей оценивали с помощью различных мер так называемого “расстояния до модели”, таких как стандартное отклонение ансамбля моделей, корреляция в пространстве моделей и расстояние Махаланобиса от тестируемой молекулы до всех молекул в наборе обучения на основе используемого набора дескрипторов [2]. Разработанные модели могут применяться для дальнейшего виртуального скрининга потенциальных ингибиторов ФДЭ-4.

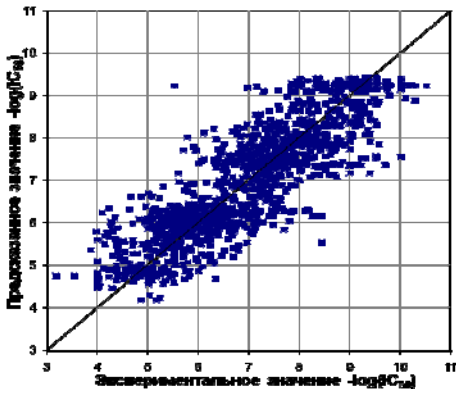


Рис. 1. Соотношение экспериментально полученного значения –log (IC_{50}) к предсказанному значению для всего набора данных.

Литература:

1.http://ochem.eu/
2.*Sushko, I.; Novotarskyi, S.; Körner, R.; Pandey, A.K.; Kovalishyn, V.V.; Prokopenko, V.V.; Tetko, I.V.* Applicability domain for in silico models to achieve accuracy of experimental measurements. J. Chemometrics. 2010, 24(3-4), 202-208.

FORECASTING QSAR MODELS FOR PHOSPHODIESTERAZE 4 INHIBITORS

Prokopenko V.V., Kovalishyn V.V., Charochkina L.L.

Institute of Bioorganic Chemistry & Petroleum Chemistry, National Ukrainian Academy of Sciences, Kyiv, Ukraine
e-mail:prokopenkov@bpci.kiev.ua

Phosphodiesterase 4 (PDE-4) controls levels of cAMP and thus regulates several cellular physiological processes such as, airway and vascular smooth muscle constriction, leukocyte responses including the proinflammatory actions of monocytes, T cells and neutrophils, gene transcription through cAMP response elements etc. Now PDE-4 has attracted considerable interest because PDE-4 selective inhibitors have potential therapeutic use in a range most of disease - asthma, osteoporosis, psoriasis, schizophrenia, depression, chronic obstructive pulmonary disease and others. The goal of the present study is the development of QSAR models that could further guide the search for new potent PDE-4 inhibitors. A data set of 1453 unique compounds with known IC_{50} values was compiled from 72 publications. This data are publicly available on-line at Online Chemical Modeling Environment (OCHEM) server. The OCHEM is a web-based platform that objectives to automatize and simplify the typical steps required for QSAR modeling [1]. The platform consists of two major subsystems: the database of experimental measurements and the modeling engine. A user database contains a set of tools for easy input, search and modification of thousands of records. The database is closely integrated with the modeling tools, which supports all the steps necessary to create a predictive model: data search, calculation and selection of a numerous variety of molecular descriptors, application of machine learning methods, validation, and analysis of the model and assessment of the applicability domain.

In the pre-processing stage all molecules were processed by the Chemaxon standardizer on OCHEM server [1]. 2D coordinates of atoms were recalculated, counter ions and salts were removed from molecular structures, molecules were neutralized. Data sets were then filtered from duplicates. 3D structures were generated using MOPAC software and stored in SDF format. The molecular descriptors were calculated by E-State indices, Dragon and ADRIANA. Code programs on OCHEM server. The initial quantity of descriptors was submitted to the following additional reduction procedure: descriptors with constant values were removed, after which a pair wise correlation analysis was performed where families of compounds were eliminated if the correlation coefficient with another descriptor was equal or higher than 0.95. A wide range of machine learning techniques have been explored, such as Multiple Linear Regression Analysis (MLRA), Support Vector machine (SVM), Associative Neural Network (ASNN), k-Nearest Neighbors (kNN) etc. The overall best performance was attained by ASNN methods (see Fig. 1). The accuracy of all individual models was estimated using 5-fold cross-validation procedures. Obtained Q^2 coefficients were in the range 0.65-072. The applicability domain of models was evaluated by using several measures of “distance to model”: standard deviation of an ensemble of models, correlation in the space of models and Mahalanobis distance of test molecule to the training set using the selected descriptors [2]. The predictive models developed can be applied during virtual screening to help in prioritizing lead discovery.

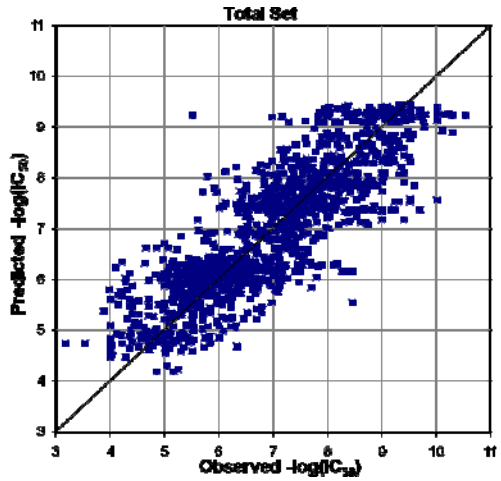


Fig. 1. Observed versus predicted –log (IC_{50}) values for total set of data.

References:

1. http://ochem.eu/
2. *Sushko, I.; Novotarskyi, S.; Körner, R.; Pandey, A.K.; Kovalishyn, V.V.; Prokopenko, V.V.; Tetko, I.V.* Applicability domain for in silico models to achieve accuracy of experimental measurements. J. Chemometrics. 2010, 24(3-4), 202-208.

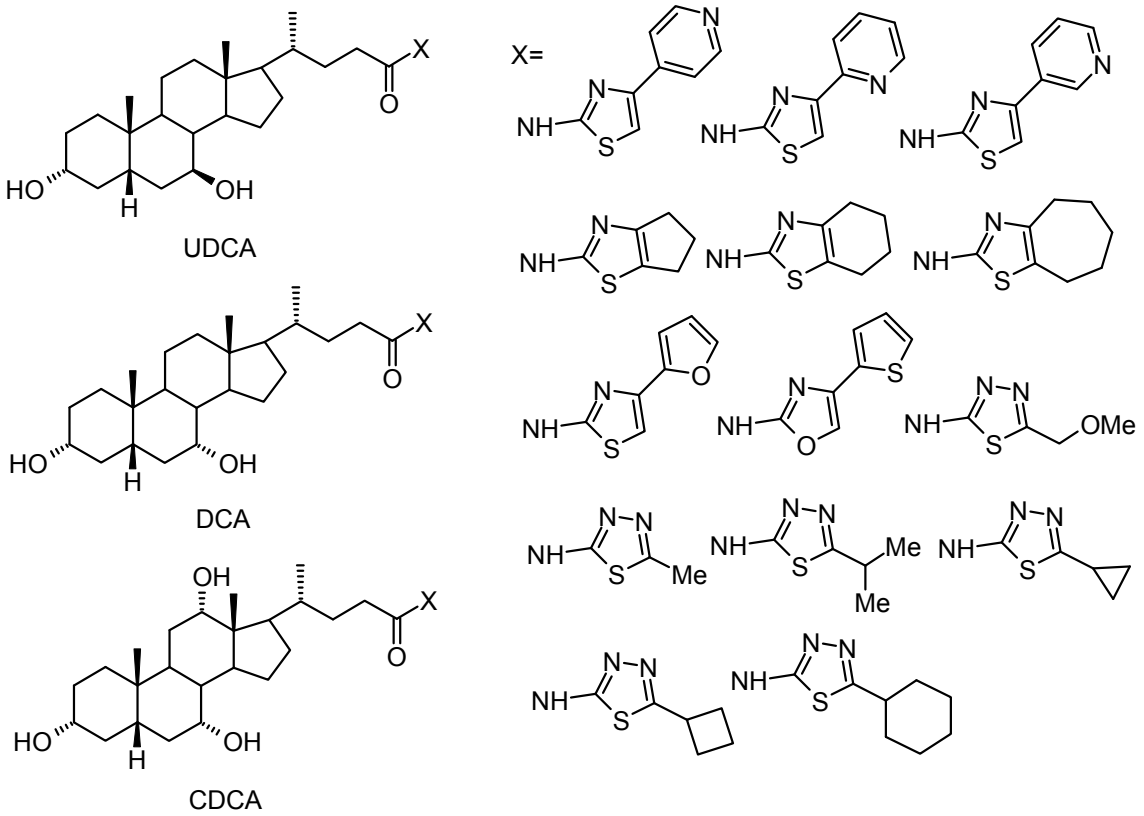
СИНТЕЗ ПОХІДНИХ УРСОДЕОКСИХОЛІЄВОЇ КИСЛОТИ ТА ЇЇ АНАЛОГІВ

Ратнікова С.Д., Белюга О.Г., Тимощук В.В., Гаразд М.М., Огороднійчук О.С.

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ, Україна
e-mail: gmm@i.com.ua

Одним із шляхів створення нових біологічно активних сполук є синтез похідних та модифікація природних біорегуляторів та вторинних метаболітів. Урсодеоксихолева кислота (UDCA) - нетоксична гідрофільна жовчна кислота, вміст якої в жовчі людини становить близько 1%. Вона використовується для розчинення жовчних каменів та терапії холестатичних захворювань печінки з аутоімунним компонентом. Високу біологічну активність проявляють і похідні UDCA, зокрема, аміди UDCA виявилися модуляторами глюкокортикоїдних рецепторів [1].

Дана робота присвячена синтезу похідних урсодеоксихолевої кислоти та її структурних аналогів – деоксихолевої (DCA) та хенодеоксихолевої (CDCA) кислот. Модифікація вказаних жовчних кислот була проведена шляхом введення в їх молекули залишків фармакофорних амінів тіазольної та тіадіазольної будови. Аміди були отримані в результаті взаємодії кислот з гетероциклічними амінами в присутності в якості конденсуючого агенту N,N-карбонілдіімідазолу або N,N-діізопропілкарбодііміду.



Література:

1. *R. Sharma, D. Prichard, F. Majer, A.-M. Byrne, D. Kelleher, A. Long, J. F.* Gilmer, Ursodeoxycholic Acid Amides As Novel Glucocorticoid Receptor Modulators, J. Med. Chem., 2011, 54, 122–130

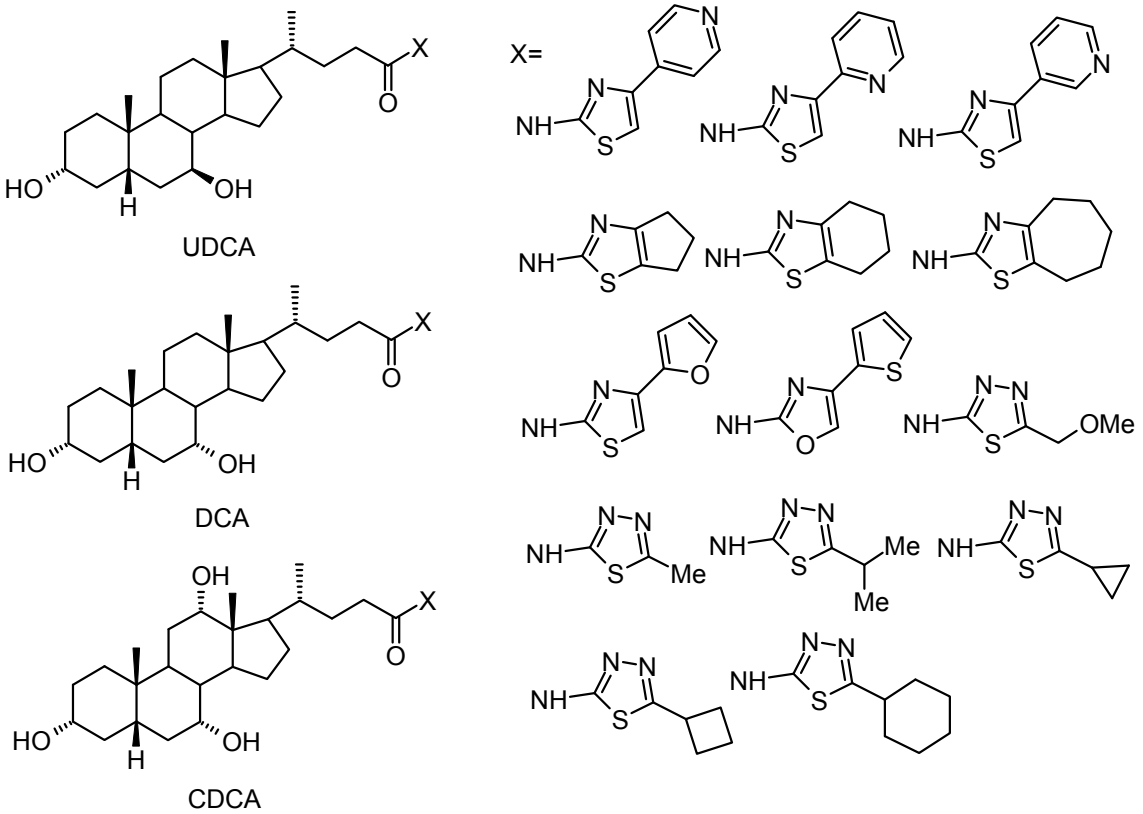
SYNTHESIS OF DERIVATIVES OF URSODEOXYCOLIC ACID AND ITS ANALOGS

Ratnikova S.D., Belyuga O.G., Tymoschuk V.V., Garazd M.M., Ogorodniychuk O.S.

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: gmm@i.com.ua

One of the ways to create new biologically active compounds is the synthesis of derivatives and modification of natural bioregulators and secondary metabolites. Ursodeoxycholic acid (UDCA) is nontoxic hydrophilic bile acid content of bile which in humans is about 1%. It is used to dissolve gallstones and treatment of cholestatic liver diseases with an autoimmune component. Derivatives of UDCA also exhibit high biological activity, in particular, UDCA amides were corticosteroid receptors modulators [1].

This work is devoted to synthesis of derivatives of ursodeoxycholic acid and its structural analogues - deoxycholic (DCA) and chenodeoxycholic (CDCA) acids. Modification of these bile acids was carried out by entering in their molecule residue pharmacophor amines thiazole and tiadiazole structure. Amides were obtained as a result of interaction of heterocyclic amines with acids in the presence of condensing agent as N, N-carbonyldiimidazole or *N,N'*-diisopropylcarbodiimide.



References:

1.*R. Sharma, D. Prichard, F. Majer, A.-M. Byrne, D. Kelleher, A. Long, J. F.* Gilmer, Ursodeoxycholic Acid Amides As Novel Glucocorticoid Receptor Modulators, J. Med. Chem., 2011, 54, 122–130

СИНТЕЗ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ АМФИФИЛЬНЫХ КРИПТАНДОПОДОБНЫХ И НАНОРАЗМЕРНЫХ УРАЦИЛОФАНОВ

Семенов В.Э., Гиниятуллин Р.Х., Михайлов А.С., Николаев А.Е., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Зобов В.В., Резник В.С.

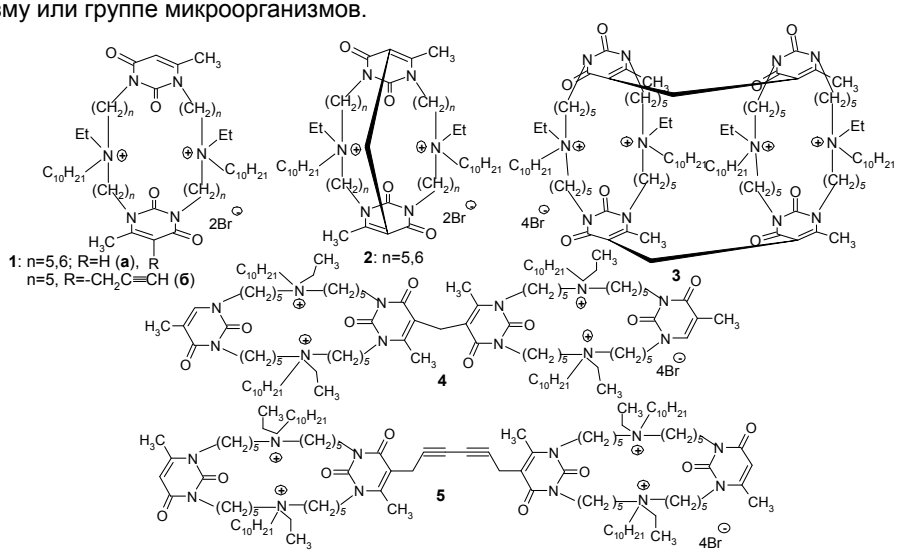
Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра РАН, Казань, Россия
e-mail: sve@iopc.ru

Макроциклические соединения, содержащие пиримидиновые фрагменты, соединенные друг с другом углеводородными мостиками, по аналогии с циклофанами получили название пиримидинофаны, и в частности урацилофаны. Нами обнаружена высокая антибактериальная активность амфифильных урацилофанов формулы 1а [1,2]. В данном сообщении описываются синтетические пути для модификации макроциклов 1а,б и антимикробные свойства полученных соединений.

Впервые введением внутримолекулярного метиленового мостика в состав урацилофанов и введением межмолекулярных метиленовых и дииновых мостиков между двумя урацилофанами с последующей кватернизацией мостиковых атомов N синтезированы криптандоподобные амфифильные урацилофаны 2 с различной длиной алкильных соединительных цепочек и амфифильные олигомерные наноразмерные урацилофаны циклического – макроцикл 3 и линейного строения – макроциклы 4 и 5. Синтез осуществляли взаимодействием соответствующего урацилофана с формальдегидом и окислительным сочетанием пропаргильных групп при урациловых фрагментах.

Переход от макроциклов 1а к внутримолекулярно ковалентно связанным криптандоподобным амфифильным урацилофанам 2 и амфифильному олигоурацилофану линейного строения 4 с межмолекулярным метиленовым мостиком, соединяющим два «мономерных» урацилофана, сопровождается значительным усилением антимикробной активности по отношению ко всему спектру используемых микроорганизмов – грам-положительным и грам-отрицательным бактериям, грибам. Особо примечательными являются высокая бактериостатическая активность урацилсодержащих криптандов 2 по отношению к Staphylococcus aureus (МИК 0.8 мкг/мл) и появление у внутримолекулярно- и межмолекулярно ковалентно связанных урацилофанов 2 и 4 достаточно высокой фунгистатической активности по отношению к дерматофиту Trichophyton mentagrophytes (МИК 7.8 мкг/мл) и дрожжевому грибу Candida Albicans (МИК 4.0 мкг/мл), отсутствующей у «мономерных» макроциклов 1а. Напротив, наноразмерный олигоурацилофан 5 демонстрирует значительное снижение антимикробной активности по сравнению с «мономерным» макроциклом 1б. Кроме того, уникальным представляется отсутствие антимикробной активности у амфифильного олигоурацилофана циклического строения 3.

Таким образом, установлена зависимость антимикробной активности амфифильных урацилофанов от взаимного расположения и ориентации урациловых фрагментов и мостиковых ониевых группировок, что свидетельствует о специфическом механизме антимикробного действия макроциклов. На основании полученных данных представляется возможным, изменяя топологию урацилофана, вводя определенные заместители в урациловый фрагмент, добиваться заданной активности по отношению к определенному микроорганизму или группе микроорганизмов.



Работа поддержана грантами РФФИ №10-03-00365, МК-64480.2010.3 и программой N9 ОХНМ РАН.

Литература:

1. *V. E. Semenov, A. D. Voloshina, E. M. Toroptzova, N. V. Kulik, etc.* Eur. J. Med. Chem. 2006, 41, 1093-1101.
2. *V. E. Semenov, A. D. Voloshina, N. V. Kulik, S. U. Uraleva, etc.* Pharm. Chem. J. 2009, 43, 448-453.

SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF AMPHIPHILIC CRYPTAND-LIKE AND NANOMETRE-SCALE URACILOPHANES

Semenov V.E., Giniyatullin R.Kh., Mikhailov A.S., Nikolaev A.E., Voloshina A.D., Kulik N.V., Zobov V.V., Reznik V.S.

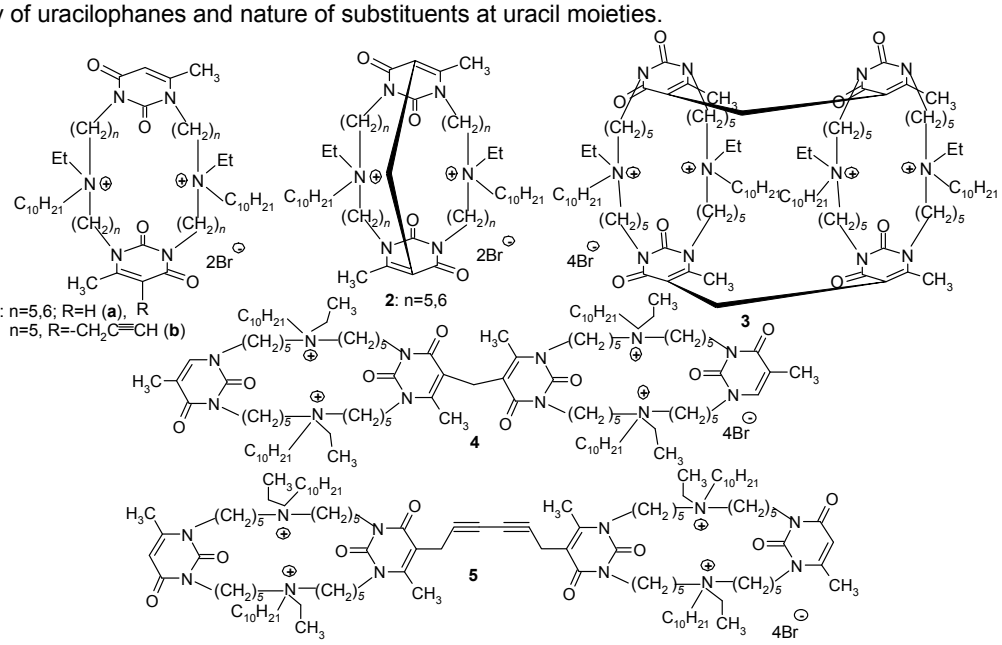
A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia
e-mail: sve@iopc. ru

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. Uracilophanes are the pyrimidinophanes with uracil moieties as pyrimidine derivatives. Previously high antibacterial activity of amphiphilic uracilophanes with formula **1a** was found [1,2]. Herein, synthetic routes for modification of the macrocycles **1a,b** and antimicrobial properties of obtained compounds are described.

For the first time amphiphilic cryptand-like uracilophanes **2** with different lengths of polymethylene chains and oligomeric nanometre-scale uracilophanes with cyclic (macrocycle **3**) and linear (macrocycles **4** and **5**) topology have been synthesized by successive intoduction of intramolecular methylene bridge and intermolecular methylene and diyne bridges, and quaternization of the N atoms in the chains. The synthesis was performed by the reactions of the corresponding uracilophane with formaldehyde and oxidative coupling of the propargyl groups at uracil moieties.

Amphiphilic cryptand-like uracilophanes **2** with intramolecular methylene bridge and linear oligouracilophane **4** with intermolecular methylene spacer, which bridges two “monomeric” uracilophanes exhibit more high activity against all tested representative Gram-negative and Gram-positive bacteria, moulds and yeast compared with the “monomers” **1a**. It is remarkable that amphiphilic cryptand-like uracilophanes **2** exhibit, first, high bacteriostatic activity against *Staphylococcus aureus* with MIC 0.8 μg/mL and, second, high fungistatic activity against dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes* and yeast *Candida Albicans* with MIC’s 7.8 and 4.0 μg/mL, respectively. It is to note that “monomeric” uracilophanes **1a** are not active against the fungi. Contrary, nanometre-scale uracilophane **5** shows a significant decrease of antimicrobial activity compared with “monomeric” uracilophane **1b**. Meanwhile, in our opinion it is an unique occurrence that amphiphilic oligouracilophane **3** doesn’t exhibit any activity with respect to tested bacteria and fungi.

In conclusion, there is the dependence of the antimicrobial activity of amphiphilic uracilophanes on mutual arrangement and orientation of uracil moieties and onium fragments in polymethylene chains. It is indicates on specific mechanism of antimicrobial activity of the studied uracilophanes. Based on the reported results it is seemed to be possible to achieve a wanted activity against certain microbe or a series of microbes altering a topology of uracilophanes and nature of substituents at uracil moieties.



This work was supported by the Basic Research Program N 9 of the Russian Academy of Sciences, RFBR grant (10-03-00365) and Russian Federation President Grant for Young Scientists (Project 64480.2010).

References:

1. *V. E. Semenov, A. D. Voloshina, E. M. Toroptzova, N. V. Kulik, etc.* Eur. J. Med. Chem. 2006, 41, 1093-1101.
2. *V. E. Semenov, A. D. Voloshina, N. V. Kulik, S. U. Uraleva, etc.* Pharm. Chem. J. 2009, 43, 448-453.

РЕГИО- И СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНЫЕ МЕТОДЫ ФЕРРОЦЕНИЛАЛКИЛИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ

Сименел А.

Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Российская Федерация
e-mail: alexsim@ineos.ac.ru

Известно, что введение ферроценового остатка в органические соединения приводит к появлению различной биологической активности, что связано с аномальной биодеструкцией ферроценовых соединений. Кроме того, было показано, что ферроценовые производные гетероциклов проявляют выраженную противоопухолевую активность в сочетании с низкой токсичностью, что было продемонстрировано в экспериментах *in vitro* и *in vivo,* на моделях перевиваемых солидных опухолей [1].

Было разработано 3 синтетических подхода для синтеза ферроценилалкилированных гетероциклов, исходя из синтетически доступных ферроценовых спиртов. Ферроценилалкилирование слабоосновных гетероциклов (таких как пиразолы, триазолы, их бензоаналоги, тетразолы, пирролы и индолы) при кислотном межфазном катализе (45% водная HBF_4) приводит к образованию ферроценилалкилазолов с высокими, а зачастую с количественными выходами. Также исследована региоселективность алкилирования несимметрично замещенных гетероциклов. Стереохимия кислотно-катализируемого ферроценилалкилирования изучена на примере взаимодействия гетероциклов с *S*-(+)-ферроценилэтанолом. Показано, что ферроценилалкилирование протекает с сохранением конфигурации у хирального атома углерода и без рацемизации.

Производные имидазола и его бензоаналогов являются достаточно сильными основаниями (p*K*a имидазола 7.00), поэтому они не вступают в реакцию ферроценилалкилирования при катализе кислотами. Нами был разработан метод введения ферроценилалкильных групп в структуру имидазола, основанный на взаимодействии ферроценилкарбинолов с *N,N'*-карбонилдиимидазолом (CDI, ImC(O)Im) в кипящем хлористом метилене [2]. Показано, что тионилсодержащие аналоги CDI сходны по своей реакционной способности с карбонилдиимидазолом в реакциях с ферроценилкарбинолами [3].

Ферроценовые производные нуклеиновых оснований были получены при взаимодействии нуклеиновых оснований с ферроценилкарбинолами в ДМСО при 100°С. Показано, что алкилирование протекает селективно по *N*-1 положению пиримидиновых оснований и по *N*-9 положению аденина. Установлен значительный противоопухолевый эффект ферроценилметилтимина в экспериментах *in vivo* [4]. Структуры синтезированных соединений были установлены на основании ^{1}H и ^{13}C ЯМР-спектров и $^{1}H/^{13}C$ гетероядерных корреляций.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (проект № 09-03-00535).

Литература:

1. *A.A.Simenel, S.V.Samarina, L.V.Snegur, Z.A.Starikova, L.A.Ostrovskaya, N.V.Bluchterova, M.M.Fomina,* Appl. Organomet. Chem. 2008; 22, 276.
2. *A.A. Simenel, E.A. Morozova, Yu.V. Kuzmenko, L.V.Snegur*, J. Organomet. Chem., 2003, 665, 13
3. *A.A. Simenel, Yu.V. Kuzmenko, E.A. Morozova, M.M. Ilyin, I.F. Gun_ko, L.V. Snegur, J.* Organomet. Chem., 2003, 688, 138
4. *A.A. Simenel, E.A. Morozova, L.V. Snegur, S.I. Zykova, V.V. Kachala, L.A. Ostrovskaya, N.V. Bluchterova, M.M. Fomina,* Appl. Organomet. Chem. 2009, *23*, 219.

REGIO- AND STEREOSELECTIVE FERROCENYLALKYLATION OF VARIOUS HETEROCYCLES

Simenel A.

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

It was found that ferrocene units being incorporated into some organic molecules or drugs significantly decrease their toxicity. Moreover antitumor activities of ferrocene-containing compounds themselves had been extensively studied *in vitro* and *in vivo*. It was demonstrated in experiments *in vivo* that ferrocene compounds with heterocyclic systems are effective against some solid tumors in mice and human tumors [1].

Ferrocenylalkylated heterocycles were synthesized accordingly to three synthetic approaches. Derivatives of non-basic azoles (such as benzotriazoles, pyrazoles, *etc*.) were prepared from ferrocenylcarbinoles via the reaction with heterocycles in CH_2Cl_2 in the presence of 45% aqueous tetrafluoroboronic acid at room temperature. The stereochemistry of the reaction with *S*-(+)-ferrocenylethanol was studied.

Since imidazole is a relatively strong base (basic p*K*a 7.00) it does not undergo *N*-ferrocenylalkylation under the acidic conditions. Therefore ferrocenylalkylimidazoles were synthesized by a simple route excluding acidic conditions from *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI, ImC(O)Im) and appropriate ferrocenylcarbinoles in boiling CH_2Cl_2 [2]. It was shown that thyonyl-containing analogs of CDI have similar reactivity in reactions with ferrocenylcarbinoles [3].

Recently we also synthesized the series of novel ferrocene-modified nucleobases from nucleobases and ferrocenylcarbinols according to a simple method using DMSO as a solvent at 100 °C; the significant antitumor effect of ferrocenylmethyl thymine was evaluated *in vivo* [4]. The structures of compounds were assigned on the basis of ^{1}H and ^{13}C NMR spectra and $^{1}H/^{13}C$ heteronuclear correlations.

Acknowledgements - *The Russian Academy of Sciences (Presidium Programs «Support for Young Scientists» and «Fundamental Sciences – for Medicine»), the Department of Chemistry and Materials Science (Project 5), and the Russian Foundation for Basic Research (RFBR № 09-03-00535).*

References:

1. *A.A.Simenel, S.V.Samarina, L.V.Snegur, Z.A.Starikova, L.A.Ostrovskaya, N.V.Bluchterova, M.M.Fomina*, Appl. Organomet. Chem. 2008; *22*, 276.
2. *A.A. Simenel, E.A. Morozova, Yu.V. Kuzmenko, L.V.Snegur, J.* Organomet. Chem., 2003, 665, 13
3. *A.A. Simenel, Yu.V. Kuzmenko, E.A. Morozova, M.M. Ilyin, I.F. Gun_ko, L.V. Snegur, J.* Organomet. Chem., 2003, 688, 138
4. *A.A. Simenel, E.A. Morozova, L.V. Snegur, S.I. Zykova, V.V. Kachala, L.A. Ostrovskaya, N.V. Bluchterova, M.M. Fomina,* Appl. Organomet. Chem. 2009, *23*, 219.

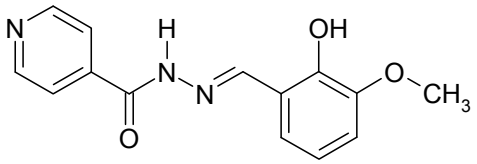
СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ГИДРАЗОНОВ И ПРОИЗВОДНЫХ 2-АМИНО-1,3,4-ТИАДИАЗОЛА

Скачилова С.Я., Кесарев О.Г., Шилова Е.В., Желтухин Н.К., Сернов Л.Н.

Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ, Старая Купавна, Россия
e-mail: vnc@pc-club.ru, skachilova@mail.ru

Химические классы производных гидразидов карбоновых кислот, также 1,3,4-тиадиазолов интересны не только комплексообразующими свойствами, но и в значительной степени их разнообразной биологической активностью.

Нами синтезированы новые гидразоны на основе гидразидов пиридинкарбоновых кислот и ароматических и гетероароматических альдегидов. Установлено влияние положения карбоксильной группы карбоновой кислоты и заместителей на реакцию конденсации и выход соединений. Изучение биологической активности соединений позволило выявить потенциальный лекарственный препарат астмазин с комбинированным механизмом действия – противовоспалительным и бронхопротективным.

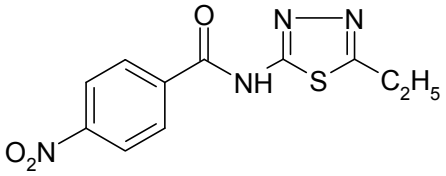


Разработана технология получения астмазина.

В ряду производных 2-амино-1,3,4-тиадиазола синтезирован ряд новых соединений. При разработке препаративных методов синтеза производных 2-амино-1,3,4-тиадиазола нами были изучены различные способы проведения реакции ацилирования с использованием в качестве ацилирующих агентов галоидангидридов различных карбоновых кислот.

Нами разработаны новые условия ацилирования с применением апротонных растворителей [1] при эквимолярном соотношении реагентов. Продолжительность реакции зависела от природы ацилирующего хлорангидрида. В результате проведенных исследований нами разработаны новые, неописанные в литературе, условия синтеза ацилированных производных 2-амино-1,3,4-тиадиазолов. Синтезированные новые соединения обладают различной биологической активностью: бронхолитической, антиаллергической, иммуностимулирующей, антибактериальной.

В качестве потенциального лекарственного средства в ряду производных 2-амино-1,3,4-тиадиазола выбран тиастмин, который обладает выраженной противоастматической и антиаллергической активностями. На основании доклинических исследований тиастмин рекомендован в качестве лекарственного средства для лечения бронхолёгочных заболеваний.



Разработана оптимальная технология получения тиастмина, а также научно-нормативная документация, определяющая показатели качества и стандартизацию препарата.

Литература:

1. *С.Я. Скачилова, Г.А. Ермакова, Н.К. Желтухин, Е.В. Шилова.* Реакции дезалкилирования и ацилирования в разработке технологии получения биологически активных веществ и лекарственных препаратов. – Тез. Докл. VIII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. Москва, 2007, Т. 4., с. 582.

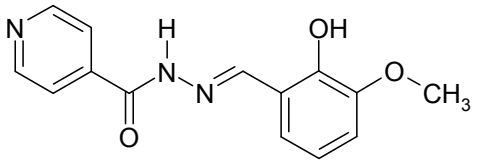
SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEW HYDRAZONES AND 2-AMINO-1,3,4-THIADIAZOLE DERIVATIVES

Skachilova S.Ya., Kesarev O.G., Shilova E.V., Zheltuhin N.K., Sernov L.N.

National Research Center on Biologically Active Compounds, Staraya Kupavna, Russia
e-mail: vnc@pc-club.ru

Chemical classes of derivatives of carboxylic acid hydrazides and 1,3,4-thiadiazoles are attractive not only due to their complexing properties, but substantially their various biological activities.

We have synthesized new hydrazones on the base of hydrazides of pyridinecarboxylic acids and aromatic and heteroaromatic aldehydes. The influence of the position of carboxyl group and substituents in carboxylic acid on the condensation reaction and yields has been determined. Study of biological activity of obtained compounds revealed a potential drug Asthmazin possessing combined mechanism of action such as anti-inflammatory and bronchoprotecive.

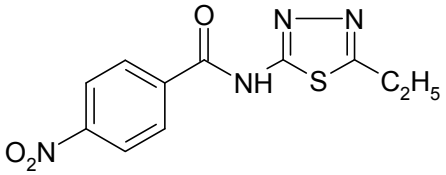


The technology of production of Asthmazin was developed.

Among derivatives of 2-amino-1,3,4-thiadiazole, a series of new compounds was synthesized. During the development of preparative methods for synthesis of 2-amino-1,3,4-thiadiazole derivatives, we studied different conditions of acylation reaction with use of different acyl halides as acylating agents.

We developed new conditions for acylation with use of aprotic solvents [1] at an equimolar ratio of reagents. The reaction time depended on the nature of acyl halide. As a result of these investigations, we developed new, unknown in the literature conditions for the synthesis of acylated 2-amino-1,3,4-thiadiazole derivatives. Synthesized new compounds have various biological activity such as bronchodilatory, antiallergenic, immunostimulating, antibacterial.

Thiasthmin has been selected among derivatives of 2-amino-1,3,4-thiadiazole as a potential medicinal product with marked anti-asthmatic and anti-allergic activities. On the basis of preclinical studies Thiasthmin was recommended as a medical product for treatment of bronchopulmonary diseases.



The optimal procedure for obtaining Thiasthmin have been developed, the scientific and technical documents required for determination of the product quality have been also developed.

References:

1. *S.Ya. Skachilova, G.A. Ermakova, N.K. Zheltuhin, E.V. Shilova*. The reactions of desalkylation and acylation for synthesis of biologically active compounds and drugs. – Theses of Reports of the XVIII Mendeleev congress on General and Applied Chemistry. Moscow, 2007, V. 4., P. 582.

ПРИМЕНЕНИЕ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

[1] Слепченко Г.Б., [1]Мартынюк О.А., [2]Шелеметьева О.В., [1]Гиндуллина Т.М.

[1]Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, Россия
e-mail: slepchenkogb@mail.ru
[2]ООО «Артлайф», Томск, Россия, e-mail: lab@artlife.com.ru

Обогащенные продукты используются в питании уже давно, хотя методы их контроля до настоящего времени несовершенны, трудоемки и не позволяют провести полную и объективную оценку качества продуктов. В связи с этим разработка экспрессных методик одновременного количественного определения водо- и жирорастворимых витаминов и флавоноидов в биологически активных добавках является актуальной задачей, от решения которой зависит качество и безопасность пищевой продукции. Широкое применение для определения биологически активных веществ находят электрохимические, в частности, вольтамперометрические, методы анализа. В последние годы наблюдается проникновение нанотехнологий в электроаналитическую химию для создания электродов нового поколения. Применение наноматериалов в электроанализе во многих случаях позволяет повысить возможности конкретных методов, в том числе обеспечить заданные метрологические характеристики и расширить круг определяемых веществ.

За период с 2006 по 2010 г.г. просмотрено более 300 литературных источников (по данным ВИНИТИ), посвященных вольтамперометрическому определению различных веществ с помощью электродов на основе наноматериалов, около 10 публикаций представляют собой статьи по определению биологически активных веществ: артемизинина, цистеина, глутатиона, гесперидина, некоторых углеводов и антиоксидантов на уровне 2.10^{-9} – 6.10^{-3} М.

Большое внимание уделено изучению физико-химического поведения и выбору условий вольтамперометрического определения неорганических элементов и органических веществ. Проведены исследования электрохимического поведения ряда основных микроэлементов (ртути, иода, селена, мышьяка и железа), а также органических веществ – антибиотиков (левомицетина, стрептомицина и тетрациклина), витаминов (B_1, B_2, С и Е) и флавоноидов (кверцетина, рутина и гесперидина), регламентированных нормативными документами. Для многих органических веществ вольтамперные кривые для концентрации на уровне 10^{-7} –10^{-9} моль/дм^3 получены впервые. Применение модифицированых золотом в режиме «in situ» графитовых электродов позволило улучшить метрологические характеристики для селена (воспроизводимость) и для ртути (чувствительность), модифицирование электродов тозилатными солями арилдиазония обеспечило повышение чувствительности при определении витамина С, витаминов группы В, и флавоноидов. Впервые модифицированные электроды применены в серийных анализах, что стало возможным благодаря четкому соблюдению условий модификации, обеспечивающих воспроизводимость поверхности электродов, и оптимизации условий получения аналитических сигналов элементов. Установлены условия количественного определения водорастворимых витаминов B_1, B_2, С, а также флавоноидов методом вольтамперометрии. Выбранные условия обеспечивают предел обнаружения 10^{-6} мг/дм^3 при определении витаминов С, B_1, B_2 на фоне 0,1 М Na_2HPO_4, для кверцетина и рутина эта величина составляет 10^{-5} мг/дм^3. Диапазон определяемых концентраций составляет от $n.10^{-2}$ до $n.10^2$ мг/кг. Время предварительной подготовки проб существенно сокращено по сравнению с другими методами из-за возможности проведения вольтамперометрических измерений в эффективно установленных условиях проведения электродного процесса в мутных и окрашенных средах. Предложенные условия определения витаминов и флавоноидов апробированы при анализе биологически активных добавок и витаминизированных пищевых продуктов.

Перспективным для контроля качества пищевых продуктов и биологически активных веществ является также метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), обладающий высокой чувствительностью, селективностью и позволяющий проводить экспрессные серийные анализы. Выбраны условия хроматографического определения водорастворимых витаминов группы В: колонка с обращенно-фазовым сорбентом Simmetry-$C_{18,}$ водно-ацетонитрильный элюент. Исследовано мешающее влияние водорастворимых витаминов и проведен расчет их предельных соотношений при определении методом ВЭЖХ с систематической погрешностью не более 15 %. Изучено влияние органической матрицы в модельных системах на основе белка, сахара, жира и пектина при определении водорастворимых витаминов и проведена оценка предела обнаружения витаминов B_1, B_2, B_3, B_5, B_6, B_9 при совместном определении их методом ВЭЖХ. Установлено, что стандартное отклонение определяемого содержания большинства водорастворимых витаминов не превышает 20 %, а для витамина B_9 - 40 %. Разработан алгоритм пробоподготовки, предложена дополнительная стадия УЗ-экстрагирования и проведена ее оптимизация на примере витамина B_9 в БАД, обогащенных пищевых продуктах и премиксах. Разработаны методики количественного химического определения B_1, B_2, B_3, B_5, B_6 B_9, А, Е и D_3 в биологически активных добавках, премиксах и пищевых продуктах. Методики метрологически аттестованы и внесены в Федеральный Реестр МВИ, что подтверждается свидетельствами об аттестации и внедрением в ряде аналитических лабораторий.

Разработанные методики обладают высокой чувствительностью, экспрессностью, пробоподготовка отличается простотой, не требует использования большого количества реактивов.

APPLICATION OF VOLTAMMETRIC AND CHROMATOGRAPHIC METHODS TO CONTROL BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES

[1]Slepchenko G.B ., [1]Martynuk O.A., [2]Shelemeteva O.V., [1]Gindullina T.M.

[1] National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russia
e-mail: slepchenkogb@mail.ru
[2]OOO «Artlife», Tomsk, Russia. e-mail: lab@artlife.com.ru

The enriched products are used in a food for a long time already, though methods of their control are imperfect, labour-consuming till now and do not allow to make full and objective evaluation test of products. In this connection working out of express procedures of simultaneous quantitative definition water- and liposoluble vitamins and flavonoids in biological active admixtures is an actual problem on which decision quality and safety of edible production depends. Wide application for biological active substances definition is found electrochemical, in particular, voltammetric, by analysis methods. Last years infiltration of nanotechnology in electroanalytical chemistry for building of electrodes of new generation is observed. Application of nanomaterials in electroanalysis in many cases allows to raise possibilities of concrete methods, including to provide the set metrological characteristics and to dilate a circle of defined materials.

During the period from 2006 to 2010 it is seen more than 300 references (according to Russian Institute for Scientific and Technical Information), devoted voltammetry to definition of various materials by means of electrodes on a basis nanomaterials**,** about 10 publications represent articles by definition of biological active substances: artemisinin, cysteine, glutathione, hesperidins, some carbohydrates and antioxidants at the level of $2.10^{-9} – 6.10^{-3}$ M.

The great attention is given to studying of physical and chemical behavior and a choice of conditions voltammetric definitions of inorganic elements and organic matters. Researches of electrochemical behavior of some basic trace elements (mercury, iod, selenium, arsenic and iron), and also organic matters – antibiotics (chloramphenicol, streptomycin and tetracycline), vitamins (B_1, B_2, C, E) and flavonoids (meletin, rutin and hesperidins), regulated by standard documents are conducted. For many organic matters voltammetric curves for concentration at level 10^{-7}-10^{-9} M are received for the first time. Application graphitized electrodes modified with gold in mode «in situ» has allowed to improve metrological characteristics for selenium (reproducibility) and for mercury (sensitivity), electrodes modified with salts of aryl diazonium tosylate were provided sensitivity in the determination of vitamin C, B vitamins, and flavonoids. For the first time the modified electrodes are applied in routine analyses that became possible thanks to accurate observance of conditions of the modification providing reproducibility of a surface of electrodes, and optimization of conditions of reception of analytical signals of elements. Conditions of quantitative definition of the water-soluble vitamins B_1, B_2, C, and also flavonoids a method voltammetric are positioned. The chosen conditions provide a limit of detection of 10^{-6} mg/dm^3 at definition of redoxons, B_1, B_2 against 0,1 M Na_2HPO_4, for meletin and rutin this size compounds 10^{-5} mg/dm^3. The range of defined concentration compounds from $n.10^{-2}$ to $n.10^2$ mg/kg. Time of the preparation of samples is essentially reduced in comparison with other methods because of carrying out possibility voltammetric measurements in effectively positioned conditions of carrying out of electrode process in the cloudy and colored mediums. The offered conditions of definition of vitamins and flavonoids are approved at the analysis biologically active admixtures and the vitaminized foodstuff.

For quality assurance of foodstuff and biological active materials the method of high-performance liquid chromatography (HPLC) is perspective also, possessing high sensitivity, selectivity and allowing to make express routine analyses. Chosen conditions of chromatographic definition of the water soluble vitamins B : a column with reversed-phase sorbent Simmetry-$C_{18,}$ water-acetonitrile eluent. Stirring influence of the water-soluble vitamins is investigated and calculation of their limiting interrelations at definition by method HPLC with a regular error no more than 15 % is carried out. Influence of an organic template in modeling systems on a basis of protein, sugar, fat and pectin is studied at definition of the water-soluble vitamins and the assessment of a limens of detection of vitamins B_1, B_2, B_3, B_5, B_6, B_9 is made at joint definition by their method HPLC. It is positioned that the standard deflection of the defined maintenance of the majority of the water-soluble vitamins does not exceed 20 %, and for vitamin B_9 - 40 %. The algorithm sample preparation is developed, the additional stage ultrasonic extraction is offered and its optimization on an example of vitamin B_9 in biological active materials, the enriched foodstuff and premixes is made. Procedures of quantitative chemical definition B_1, B_2, B_3, B_5, B_6 B_9, A, E and D_3 in biological active admixtures, premixes and foodstuff are developed. Procedures metrological are certified and led in Federal List of Measurement procedures that proves to be true certificates on certification and introduction in a number of analytical laboratories.

The developed procedures possess high sensitivity, expressive, sample preparation differs simplicity, does not demand use of a considerable quantity of reagents.

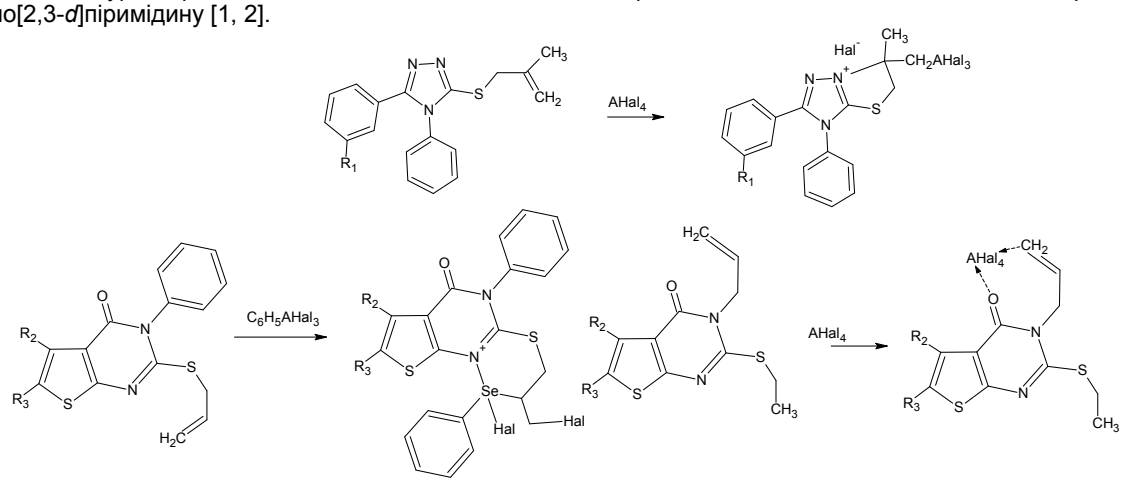
ТЕХНОЛОГІЯ СТВОРЕННЯ БАКТЕРИЦИДІВ НА ОСНОВІ СЕЛЕН-, ТЕЛУРОВМІСНИХ ГЕТЕРОЦИКЛІВ

Сливка М.В., Кривов'яз А.О., Коваль Г.М., Сливка М.В., Русин І.Ф., Лендєл В.Г.

ДВНЗ «Ужгородський національний університет», Ужгород, Україна
e-mail: mvslivka@email.ua, 1977andr13@mail.ru

На сучасному етапі розвитку хімії лікарських засобів актуальними є пошук та розробка нових підходів й стратегій створення біологічно активних речовин – майбутніх лікарських препаратів. Одним із ефективних шляхів пошуку й створення біологічно активних сполук є розробка методів введення в органічну молекулу біологічно активних неорганічних фрагментів. Особливу увагу в цьому плані привертають методи введення селен й телур галогенідних фрагментів в склад гетероциклічних систем різної природи, оскільки Селен й Телур є важливими мікроелементами і входять до складу багатьох препаратів, які володіють бактерицидною й фунгіцидною активністю. Таким чином, розробка технології введення селен й телур галогенідних фрагментів в склад гетероциклічних систем дозволить проводити цілеспрямований синтез біологічно активних сполук, а також призведе до зниження токсичності селен й телур галогенідних сполук.

В якості базового методу введення селен й телур галогенідних фрагментів нами обрано метод електрофільної гетероциклізації; в якості електрофільних реагентів використано: фенілселентригалогеніди, селен й телур тетрагалогеніди; в якості модельних гетероциклів – ненасичені похідні 1,2,4-триазолу, тієно[2,3-*d*]піримідину [1, 2].



A = Se, Te. Hal = Cl, Br. R_1 = H, OCH_3. R_2,R_3 = $(CH_2)_3$, $(CH_2)_4$; R_2=R_3=CH_3.

Реакції проводили в середовищі оцтової кислоти при кімнатній температурі чи охолодженні (у випадку введення атому Селену) та при нагріванні (у випадку введення атому Телуру). Склад отриманих продуктів підтверджено елементним аналізом та методом мас спектрометрії; структуру підтверджено ІЧ спектрами, спектрами ЯМР ^{1}H, ^{13}C, ^{79}Se та гомоядерними й гетероядерними кореляціями.

Здійснено моніторинг перспектив використання отриманих сполук, зокрема, проведено попередні дослідження на антимікробну активність [2]. Результати досліджень показали, що бактерицидну активність проявили усі досліджувані селеновмісні речовини та більшість телурорганічних сполук. Всього було досліджено 10 культур різних токсономічних груп: грампозитивні (*Staphylococcus albus, Staphylococcus aureus 209, Sarcina flava, Bacillus subtilis, Candida albicans*) та грамнегативні (*Klebsiella pheumoniae, Klebsiella oxytoca, Pseudom aeruginosa*). Показано, що культури *Micrococcus luteus* ATCC 3941 та *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 були найбільш чутливими до дії сполук тієнопіримідинового ряду. Виявлено, що лише селеновмісні тієнопіримідини є активними по відношенню до бактерій *Candida albicans* ATCC 885-653, які є стійким навіть до антибіотиків III-IV покоління. Більшість із використаних в біологічних дослідженнях сполук, має широкий спектр антимікробної активності, активно пригнічує ріст музейних штамів і клінічних ізолятів умовно патогенних мікроорганізмів з множинною стійкістю до антибіотиків. В результаті цього постало питання про розробку комплексних лікарських препаратів, адже в лікарнях дані мікроорганізми перебувають в основному в складі стійких мікробних ценозів, про що свідчать проведені нами дослідження. На даний момент, результати досліджень впроваджено в лікарняних умовах обласної клінічної інфекційної лікарні (м. Ужгород), зокрема, проведено перевірку чутливості патогенних свіже виділених бактерій до ново-синтезованих речовин в бак лабораторії лікарні.

Література :

1. *І.Ф.Русин, М.В. Сливка, В.Г. Лендєл.* Дослідження регіоселективності взаємдії 3-(2-метил-2-пропеніл)-3-тіо-4,5-дифеніл-1,2,4-триазолу з тетрагалогенідами селену і телуру. // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2010. – Т.8., Вип. 1(29). – С. 67-70.
2. Патент (Україна), заявка № 53671 U, МПК C07 D 498|00, C07 D 513|00, C07 D 517|00, C12 Q 1|18. Солі тієно [3',2':5,6] піримідино[2,1-b][1,4,3]тіаселеназин-12-ію, що мають антимікробну активність. /Кривов'яз А.О., Коваль Г.М., Сливка М.В., Лендєл В.Г. / Заявл.03.04.2010. Опубліковано 11.10.2010. Бюл. № 19, 8с.

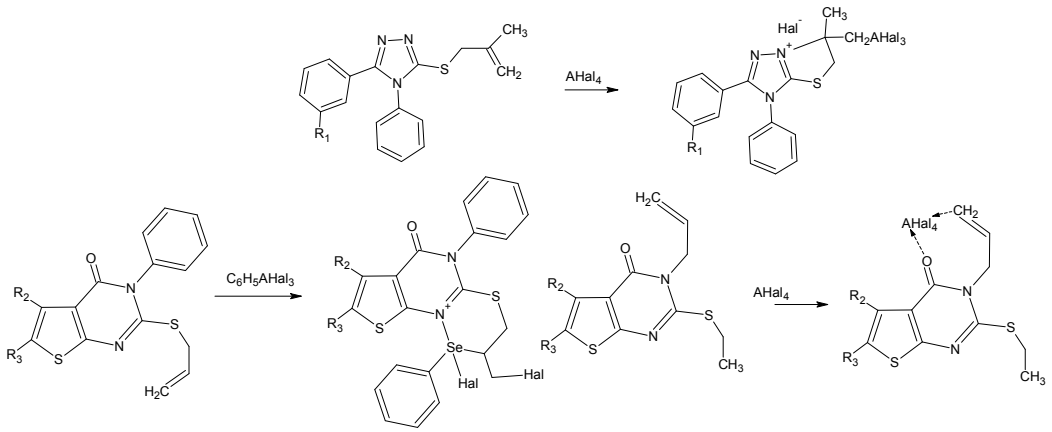
TECHNOLOGY OF THE CREATION OF SELENIUM-, TELLURIUM-CONTAINING HETEROCYCIC BACTERICIDES

Slivka M.V., Kryvov'yaz A.A., Koval' G.M., Slivka Mar.V., Rusyn I.F., Lendel V.G.

National University of Uzhgorod, Uzhgorod, Ukraine
e-mail: mvslivka@email.ua, 1977andr13@mail.ru

At the present stage of the development of drug chemistry the search for and elaboration of new approaches and strategies of the creation of biologically active substances - future drugs – are considered to be vital. One of the effective ways of the search for and creation of biologically active compounds is the development of the methods of the introduction of bioactive inorganic fragments into an organic molecule. In this respect particular attention is attracted to the methods of the introduction of selenium and tellurium halogenide fragments into the structure of heterocyclic systems of different nature, since Selenium and Tellurium are essential trace elements and are part of many drugs, which have bactericidal and fungicidal activity. Thus, the development of the technology of the introduction of selenium and tellurium halogenide fragments into the structure of heterocyclic systems will make it possible to conduct the targeted synthesis of biologically active compounds, and will reduce the toxicity of selenium and tellurium halogenide compounds.

The method of electrophilic heterocyclization was chosen as a basic method of introduction of selenium and tellurium halogenide fragments; phenol selenium trihalogenides, selenium and tellurium tetrahalohenides were used as electrophilic reagents; unsaturated 1,2,4-triazole, thieno [2,3 - d]pyrimidine [1, 2] derivatives were used as sample heterocycles.



Reactions were conducted in acetic acid medium at room temperature; it was chilled when selenium was introduced and heated in case of tellurium introduction. The composition of products obtained is confirmed by elemental analysis and mass spectrometry; the IR spectra, the 1H-, 13C- and 79Se-NMR spectra as well as homonuclear and heteronuclear correlations confirmed the structure.

The prospects of the application of the synthesized compounds were monitored; in particular, the preliminary research into antimicrobial activity was carried out [2]. The results showed that all the investigated seleniumcontaining substances and most tellurium organic compounds demonstrated the bactericidal activity. In total 10 cultures of different taxonomic groups were examined: gram-positive (*Staphylococcus albus, Staphylococcus aureus 209, Sarcina flava, Bacillus subtilis, Candida albicans*) and gram-negative (*Klebsiella pheumoniae, Klebsiella oxytoca, Pseudom aeruginosa*). It was discovered that the cultures *Micrococcus luteus* ATCC 3941 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25 923 were the most susceptible to the action of the compounds of a thienopyrimidine series. It was found that only selenium-containing thienopyrimidines are active against the bacteria *Candida albicans* ATCC 885-653, the latter being resistant even to antibiotics of the III-IV generation. Most of compounds that were used in the research have a broad spectrum of antimicrobial activity; they actively suppress the growth of museum strains and clinical isolates of conditionally pathogenic microorganisms with multiple antibiotic resistance. The research results have caused the need to develop complex pharmaceuticals, since these microorganisms are mainly part of stable microbial cenoses in hospitals, which is proved by the conducted research. So far the research results have been implemented in hospital conditions at Regional Clinical Infectious Diseases Hospital (Uzhgorod), in particular the examination of the sensitivity of newly-secreted pathogenic bacteria to newly synthesized substances was conducted in the hospital bacteriological laboratory.

References:

1.*І.Ф.Русин, М.В. Сливка, В.Г. Лендєл.* Дослідження регіоселективності взаємдії 3-(2-метил-2-пропеніл)-3-тіо-4,5-дифеніл-1,2,4-триазолу з тетрагалогенідами селену і телуру. // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2010. – Т.8., Вип. 1(29). – С. 67-70.
2.Патент (Україна), заявка № 53671 U, МПК C07 D 498|00, C07 D 513|00, C07 D 517|00, C12 Q 1|18. Солі тієно [3',2':5,6] піримідино[2,1-b][1,4,3]тіаселеназин-12-ію, що мають антимікробну активність. /Кривов'яз А.О., Коваль Г.М., Сливка М.В., Лендєл В.Г. / Заявл.03.04.2010. Опубліковано 11.10.2010. Бюл. № 19, 8с.

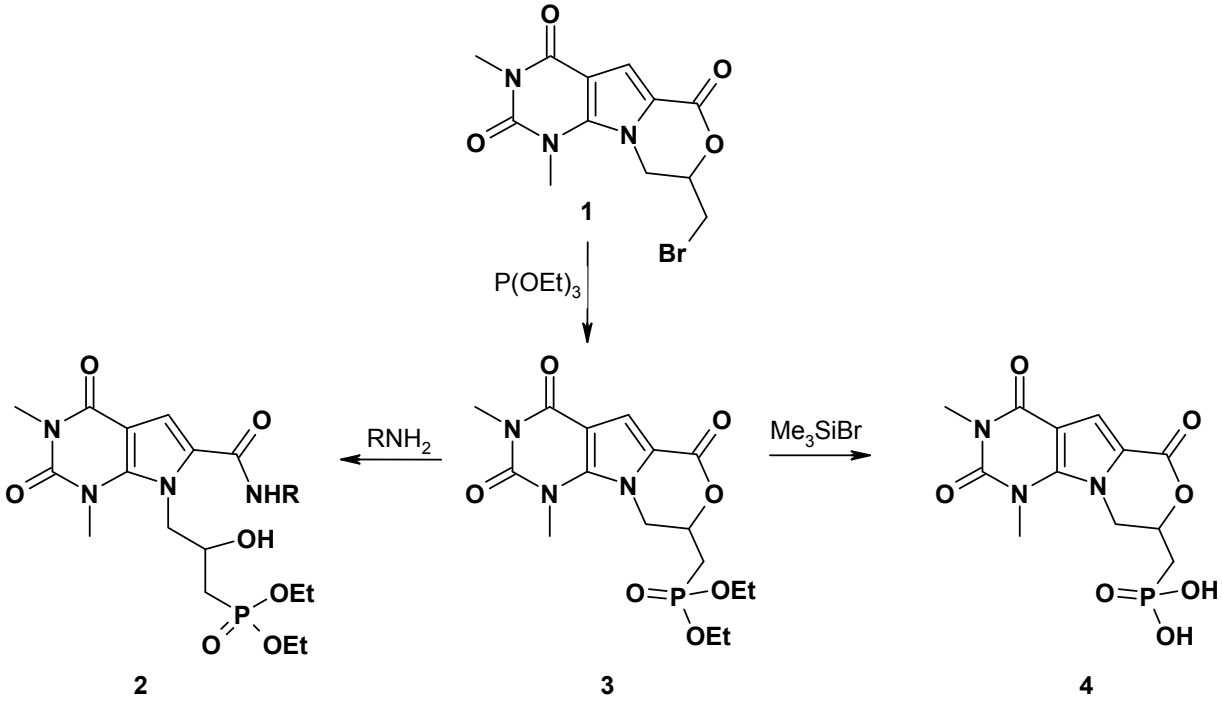
НОВЫЙ ПОДХОД К СИНТЕЗУ СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ АДЕФОВИРА

Смолий О.Б., Яремчук И.О., Музычка Л.В.

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: Smolii@bpci.kiev.ua

Известно, что ациклические аналоги нуклеозидов проявляют высокую антивирусную активность. В последние годы для лечения ВИЧ-инфекции и гепатита В успешно применяются препараты – адефовир и тенофовир, которые являются нуклеотидными ингибиторами обратной транскриптазы.

Нами предложен новый подход для получения структурных аналогов адефовира. Использование реагента (1), представителя новой трициклической системы [1], дало возможность получить с высоким выходом производное 7-деазапурина (2 - 4) с алкилфосфорильными заместителями возле атома азота пиррольного кольца. Строение и состав полученных соединений подтверждены при помощи физико-химических методов и элементного анализа.



Литература:
1. *О.Б. Смолий, Л.В. Музычка, Е.В. Вервес,* ХГС, 1594 (2009).

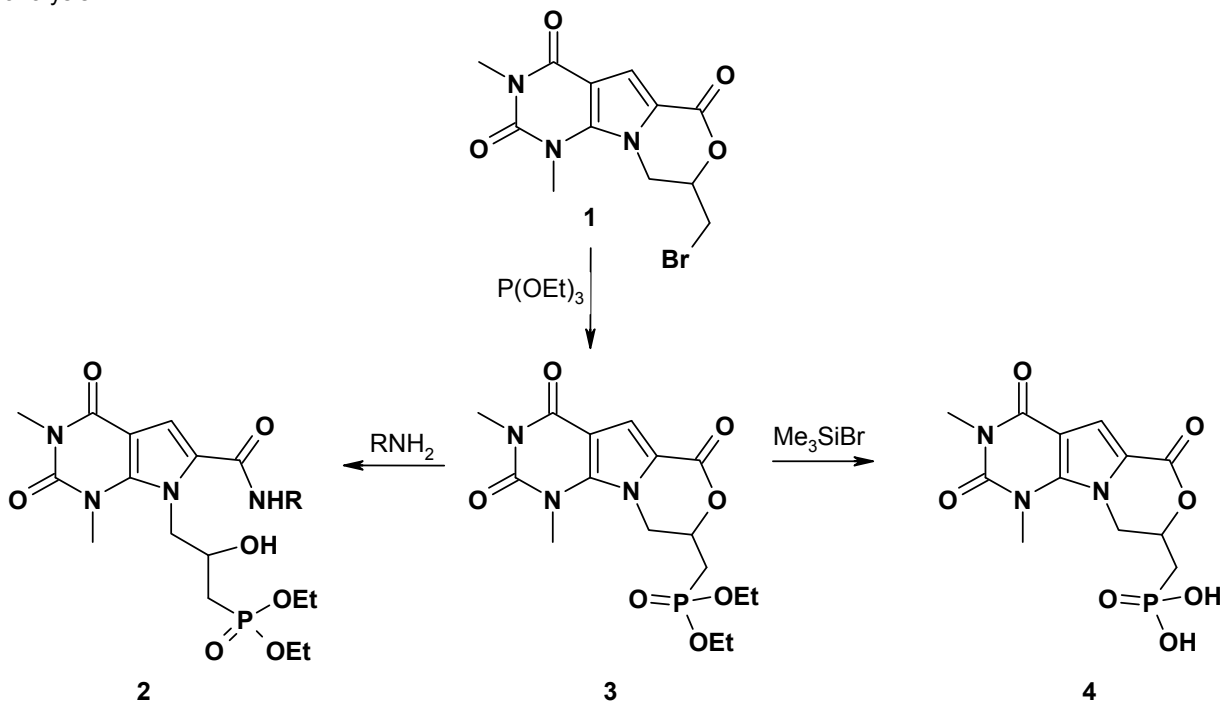
A NEW APPROACH FOR THE SYNTHESIS OF STRUCTURAL EQUIVALENTS TO ADEFOVIR

Smolii O.B., Yaremchuk I.O., Muzychka L.V.

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry National Academy of Science of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: smolii@bpci.kiev.ua

It is known that thea cyclic nucleoside analogues provide high antiviral activity. Substances as adefovir and tenofovir have been successfully used for the treatment of HIV infection and hepatitis B in recent years. These drugs are nucleotide reverse transcriptase inhibitors.

We have proposed a new approach for obtaining structural analogs to adefovir. Application of a reagent (1), (a representative of the new tricyclic system [1]) allowed for preparation in a yield derivative of 7-deazapurine (2-4) having phosphoryl substituents at the Nitrogen atom position of the pyrrole ring. The structure and composition of the synthesized compounds have been confirmed by physicochemical (analytical) methods and elemental analysis.



References:
1. *О.Б. Смолий, Л.В. Музычка,* Е.В. Вервес, ХГС, 1594 (2009).

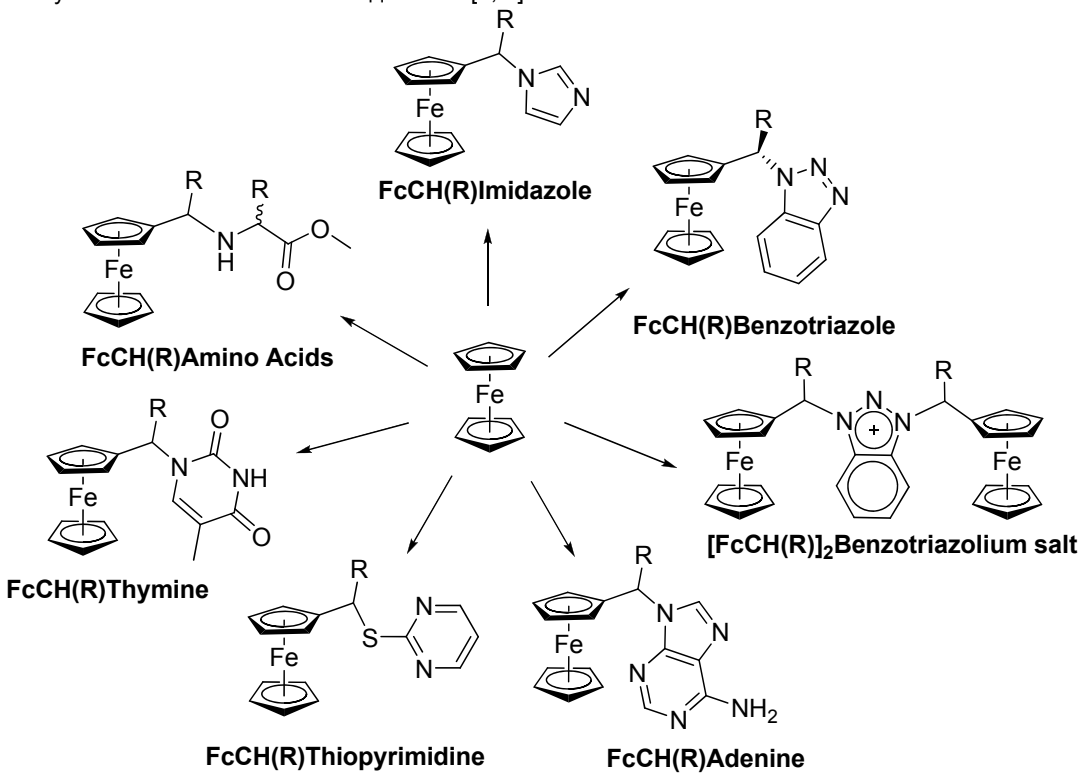
ФЕРРОЦЕНОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Снегур Л.В.

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

Со времени открытия ферроцена в 1951 г. велись интенсивные исследования, связанные с поиском новых активных соединений для терапии патологий, вызванных дефицитом железа в организме. Результатом поисков явилось создание оригинального препарата ФЕРРОЦЕРОН, разработанного ИНЭОС АН СССР и Ленинградским институтом гематологии и переливания крови. Препарат представляет собой натриевую соль *орто*-карбоксибензоилферроцена и до настоящего времени является единственным лекарственным соединением на основе ферроцена, рекомендованным к использованию для лечения анемии, озены.

Противоопухолевая активность ферроцен-содержащих соединений интенсивно изучается в течение последних двух десятилетий [1]. В экспериментах *in vivo* установлено, что ферроценовые соединения с гетероциклическими фрагментами (Схема) эффективны по отношению к некоторым сóлидным опухолям животных и опухолям человека, эти соединения также ингибируют синтетические процессы в ДНК [1, 2]. Биологическая активность ферроценовых соединений обусловлена уникальными свойствами ферроцена: липофильностью и способностью проникать через мембраны, низкой токсичностью, редокс-активностью, хиральностью, жесткой структурой. Ферроценовый фрагмент может быть легко модифицирован. Серия новых ферроценовых производных нуклеиновых оснований, азолов, аминокислот (Схема) была нами синтезирована из гетероциклов или эфиров аминокислот и ферроценовых спиртов, изучены противоопухолевые свойства этих соединений [1, 2].



Обсуждаются возможные механизмы биологической активности ферроцен-модифицированных соединений, принимая во внимание результаты тестов по противоопухолевой активности, структурные и электрохимические данные, а также химические модификации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академией наук (программа Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине»), Отделением химии и наук о материалах РАН (программа фундаментальных исследований «Медицинская и биомолекулярная химия») и Российским Фондом Фундаментальных Исследований (Проект РФФИ №09-03-00535).

Литература:

1. *Л.В. Снегур, В.Н. Бабин, А.А. Сименел, Ю.С. Некрасов, Л.А. Островская, Н.С. Сергеева*, Противоопухолевая активность соединений ферроцена, Изв. АН. Сер. хим., 2010, 2113-2124.
2. *A.A. Simenel, G.A. Dokuchaeva, L.V. Snegur et al.,* Ferrocene-modified thiopyrimidines: synthesis, enantiomeric resolution, antitumor activity, Appl. Organomet. Chem., 2011, *25*, 70-75.

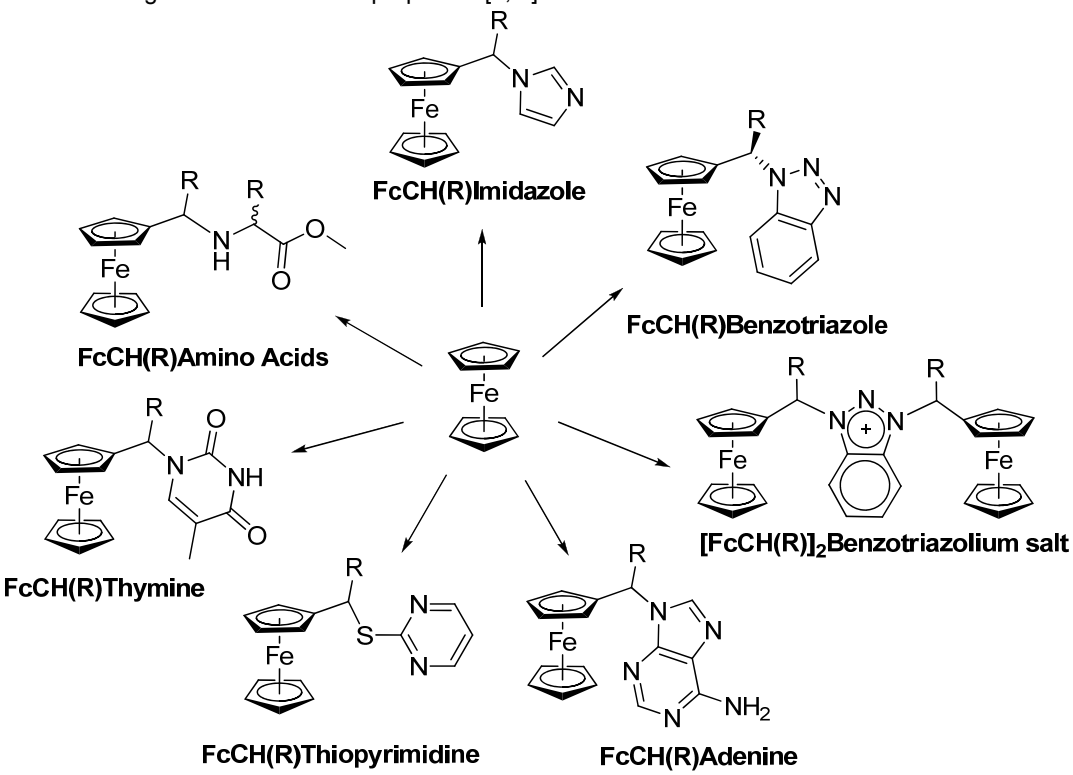
FERROCENE-BASED COMPOUNDS FOR MEDICINAL APPLICATIONS

Snegur L.V.

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

Since 1951 when ferrocene was discovered intensive research into novel drugs for chemotherapy for the treatment of iron deficiency anemia, cancer led to the appearance a new class of ferrocene-based compounds with significant antianemic, antitumor effectiveness. At the same time these compounds were lost some negative toxic side-effects of the clinical used anticancer drugs (mainly haemato- and hepato-toxicity). It was found that ferrocene units incorporated into some organic molecules or drugs and vitamins significantly decreased their acute toxicity. Maximal tolerated does (MTD) consist of 400–1500 mg kg^{-1} for uncharged ferrocene-modified compounds, for middle toxicity ferricenium salts LD_{50} 180–300 mg kg^{-1} [1].

Antitumor activities of ferrocene-containing compounds had been extensively studied *in vitro* and *in vivo* in the past two decades [1]. In experiments *in vivo* it was demonstrated that ferrocene compounds with heterocyclic systems (Scheme below) are effective against some animal solid tumors and human tumors, they are also displayed DNA synthesis inhibitory effects [2]. The biological activity of ferrocene compounds is closely related to their unique properties: lipophilicity and membrane permeability, low toxicity, planar chirality, redox activity and bulky structure. The ferrocenyl unit has been successfully modified. We synthesized the series of novel ferrocene-modified nucleobases, azoles and amino acids from heterocycles and ferrocenyl carbinols according to simple methods and investigated their antitumor properties [1, 2].



The possible biological activity mechanisms including a telomerase activity modulation for ferrocene-modified compounds are discussed taking into consideration the results of the antitumor activity tests and the structural and electrochemical data, chemical transformation routes.

This work was supported by the Russian Academy of Sciences (Presidium Program "Fundamental Sciences – for Medicine"), by the Department of Chemistry and Materials Science (Program 'Medicinal and Biomolecular Chemistry'), and by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR No 09-03-00535).

References:

1. *L.V. Snegur, V.N. Babin, A.A. Simenel, Yu.S. Nekrasov, L.A. Ostrovskaya, N.S. Sergeeva,* Antitumor activities of ferrocene compounds, Russ. Chem. Bull., 2010, *No. 12.*
2. *A.A. Simenel, G.A. Dokuchaeva, L.V. Snegur et al.,* Ferrocene-modified thiopyrimidines: synthesis, enantiomeric resolution, antitumor activity, Appl. Organomet. Chem., 2011, *25*, 70-75.

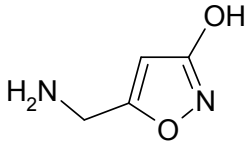
РЕГИОСЕЛЕКТИВНЫЙ СИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 3-ГИДРОКСИИЗОКСАЗОЛА

Стрижак А.В., Горичко М.В., Комаров И.В.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина
e-mail: alex.strizhak@gmail.com

Производные 3-гидроксиизоксазола являются интересным классом лигандов для ГАМК-рецепторов, в которых гетероциклический фрагмент является изостерическим конформационно жестким аналогом карбоксильной группы 4-аминомасляной кислоты [1]. Кроме того мускимол **1** встречается в природе и есть психоактивным алкалоидом грибов семейства *Amanita*. Несмотря на то, что описано несколько методов синтеза соединений данного типа, их проблемой является региоселективность реакции 1,3-дикарбонильного предшественника изоксазола с гидроксиламином, что ведет к низким выходам нужного изомера гидроксипроизводного изоксазола и сложности его выделения и очистки.

Нами был разработан препаративный метод синтеза 5-замещенных-3-гидроксиизоксазолов путем реакции [2] 5-ацилпроизводного 2,2-диметил-1,3-диоксан-4,6-диона **6** с 1,2-ди-*Boc* гидроксиламином **3**, что проиллюстрировано на примере синтеза 5-(4-пиперидил)-3-изоксазолола **4** (4-PIOL) (схема 1).



1, Мускимол

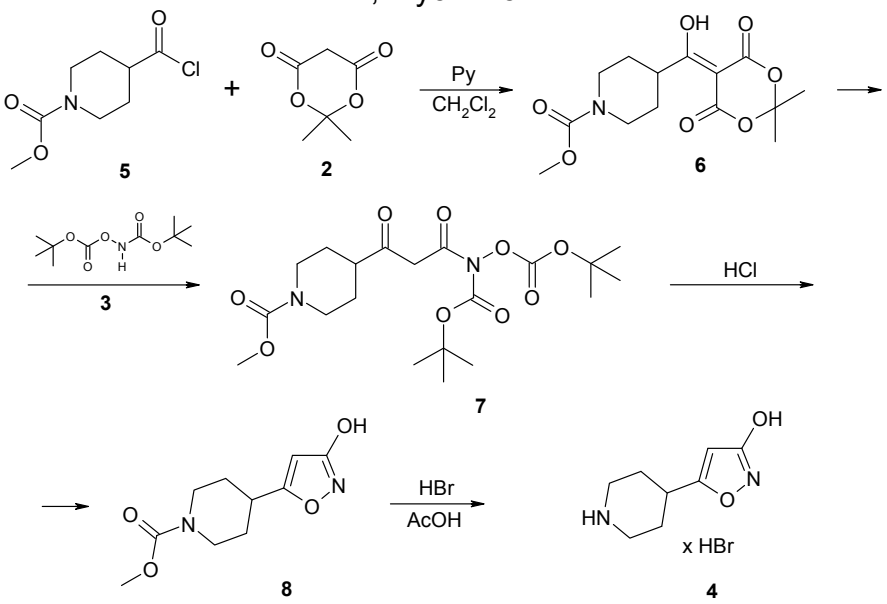


Схема 1

На первой стадии кислота Мельдрума **2** была проацилирована хлорангидридом N-метоксикарбонилизонипекотиновой кислоты **5**. Ключевой стадией является реакция полученного ацилпроизводного **6** с защищенным производным гидроксиламина **3**, единственным продуктом которой является защищенная гидроксамовая кислота **7**. Далее после кислотного снятия *Boc*-защиты и немедленной последующей циклизации был получен изоксазол **8**. Конечный продукт **2** в виде бромгидрата был получен путем снятия метоксикарбонильной защитной группы действием бромистого водорода в уксусной кислоте. Данный метод может быть распостранен на синтез разнообразных аналогов **4**, а также для синтеза мускимола **1** и структурно подобных соединений.

Литература:

1. *Frolund B., Jorgensen A.T., Tagmose L. et al* // Novel Class of Potent 4-Arylalkyl Substitutet 3-Isoxazolol $GABA_A$ Antagonists: Synthesis, Pharmacology, and Molecular Modeling – J. Med. Chem., 2002, **45**, 12, p. 2454-2468
2. *Sorensen U.S., Falch E., Krogsgaard-Larsen P.* // A Novel Route to 5-Substituted 3-Isoxazolols. Cyclisation of N,O-DiBoc β-Keto Hydroxamic Acids Synthesized via Acyl Meldrum's Acids – J. Org. Chem., 2000, **65**, 4, p. 1003-1007/

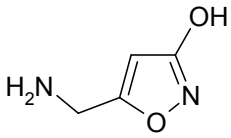
REGIOSELECTIVE SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE DERIVATES OF 3-HYDROXYISOXAZOLE

Strizhak O.V., Gorichko M.V., Komarov I.V.

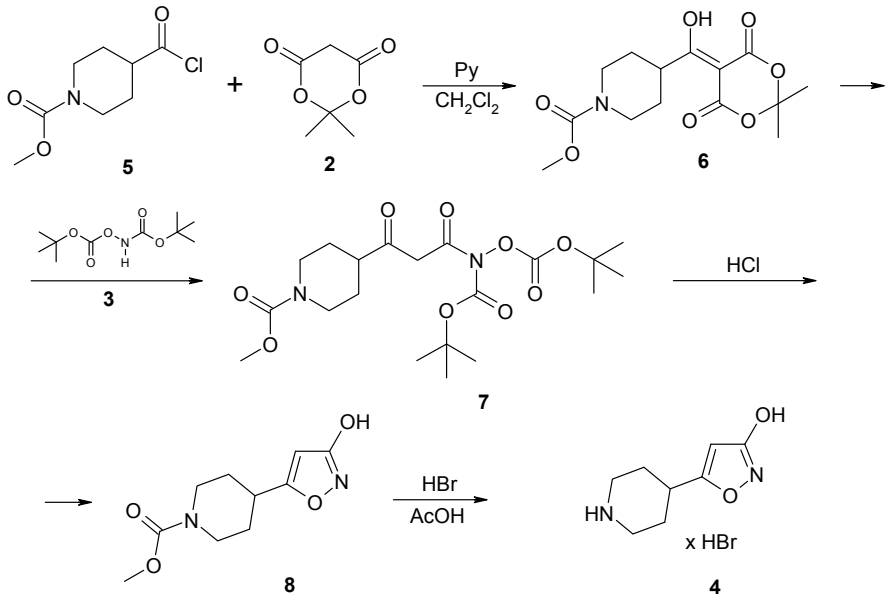
Taras Shevchenko National University of Kiev, Kiev, Ukraine
e-mail: alex.strizhak@gmail.com

Derivates of 3-hydroxyisoxazole are interesting class of GABA-receptors ligands which contain heterocyclic fragment as isosterical conformationally rigid analog of carboxyl group of 4-aminobutyric acid [1]. Also muscimol **1** is natural compound and present as psychoactive alkaloid of mushrooms of the *Amanita* genius. Despite several methods of synthesis of such derivates are described, they have common problem with regioselectivity of reaction of 1,3-dicarbonyl precursor of isoxazole with hydroxylamine. As a result desired isomer of hydroxyisoxazole is obtained in low yield and there are problems with its separation and purification.

We have developed preparative synthesis of 5-substituted 3-hydroxyisoxazoles by the reaction [2] of 5-acyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione **6** with 1,2-di-*Boc* hydroxylamine **3**, which is illustrated by the synthesis of 5-(4-piperidyl)-3-isoxazolol **4** (4-PIOL) (scheme 1).



1, Muscimol



Scheme 1

On the first stage Meldrum's acid **2** was acylated by N-methoxycarbonylisonipecotic acid chloride **5**. Reaction of obtained acyl derivate **6** with protected hydroxylamine **3** was the key step of the synthesis, which leads to protected hydroxamic acid **7** as the single product. The target compound **2** was obtained as bromohydrate after HBr/AcOH deprotection. This method can be used for synthesis of different analogs of **4**, and also for synthesis of muscimol **1** and similar compounds.

Reference:

1. *Frolund B., Jorgensen A.T., Tagmose L. et al* // Novel Class of Potent 4-Arylalkyl Substitutet 3-Isoxazolol $GABA_A$ Antagonists: Synthesis, Pharmacology, and Molecular Modeling – J. Med. Chem., 2002, **45**, 12, p. 2454-2468
2. *Sorensen U.S., Falch E., Krogsgaard-Larsen P.* // A Novel Route to 5-Substituted 3-Isoxazolols. Cyclization of N,O-DiBoc β-Keto Hydroxamic Acids Synthesized via Acyl Meldrum's Acids – J. Org. Chem., 2000, **65**, 4, p. 1003-1007

АКТИВАТОРЫ ГЛЮКОКИНАЗЫ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ 2-ПИРИДИНИЛМОЧЕВИНЫ

Тарасова И.В., Семенов А.В., Петров П.С., Храмов В.С., Семенова Е.В.

Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева, Саранск, Россия
e-mail: tarasova_iv_mrsu@mail.ru

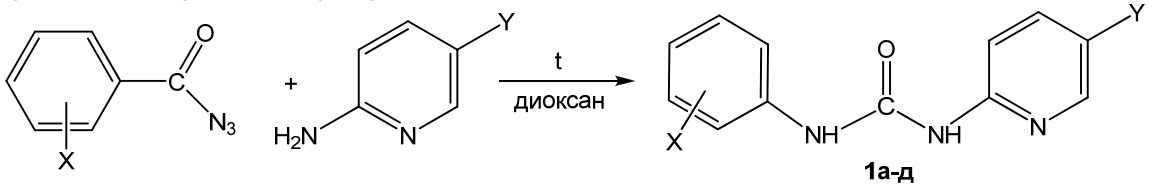
Сахарный диабет 2 типа – широко распространенное заболевание с высокой инвалидизацией и смертностью среди больных. Современная терапия не обеспечивает достижения адекватного контроля уровня глюкозы в крови, поэтому растет необходимость в создании новых лекарственных препаратов с большей эффективностью при лечении данной патологии.

Одной из современных тенденций в лечении сахарного диабета 2 типа является разработка синтетических активаторов глюкокиназы − фермента, участвующего в ключевой стадии гликолиза. Анализ структур соединений, описанных в литературе в качестве активаторов глюкокиназы, показывает, что ключевую роль в связывании их с ферментом в аллостерический сайт играет наличие в структуре нескольких гетероатомов, способных участвовать в образовании водородных связей и вступать в иные межмолекулярные взаимодействия. Чаще всего в качестве потенциальных активаторов глюкокиназы выступают производные пиримидина, пиридина и тиазола, содержащие в своем составе карбаматный или мочевиновый фрагменты [1-4].

С целью выявления потенциальных активаторов глюкокиназы нами был проведен виртуальный скрининг ряда гетероциклических структур, содержащих в своем составе мочевиновый фрагмент. Анализ проводился методом полугибкого докинга с помощью программного пакета DOCK 6.4 [5]. Процедура докинга была проведена с использованием алгоритма постепенного конструирования. Для ранжирования лигандов была применена оценочная функция, основанная на силовых полях AMBER. После визуального фильтрования результатов скрининга в качестве соединений-лидеров был отобран ряд производных 2-пириди-нилмочевины (**1а-д**), удовлетворяющих критериям стерического соответствия и имеющих лучшие значения свободной энергии связывания.

Основной синтетический подход при получении хит-соединений (несимметричных дизамещенных производных мочевины) сводится к взаимодействию первичных аминов с изоцианатами. Однако изоцианаты являются труднодоступными и высокотоксичными соединениями, поэтому в препаративных реакциях целесообразнее использовать их синтетические эквиваленты, например, ацилазиды, легко получающиеся из соответствующих карбоновых кислот.

В связи с этим синтез целевых соединений был осуществлен путем взаимодействия 2-амино-пиридинов с замещенными фенилизоцианатами, генерируемыми *in situ* из соответствующих ацилазидов в результате перегруппировки Курциуса при кипячении их в диоксане в течение 1-1,5 ч [6]:



1а-д

X, Y = H (**а**); X = *м*-NO_2, Y = H (**б**);
X = *п*-NO_2, Y = H (**в**); X = *м*-NO_2, Y = NO_2 (**г**);
X = *п*-NO_2, Y = NO_2 (**д**)

Выходы соединений **1а-д** после очистки кристаллизацией из водного этанола составили более 80%. Их структура надежно подтверждена методами ИК, ЯМР ^{1}H и ^{13}C спектроскопии.

Таким образом, мочевины **1а-д** после проведения биологического тестирования могут служить основой для создания новых препаратов из класса активаторов глюкокиназы для лечения социально значимой патологии – сахарного диабета 2 типа.

Литература:

1. *K. Kamata, M. Mitsuya, T. Nishimura, J. Eiki, Y. Nagata* // Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase – Structure, 2004, Vol. 12, P. 429−438.
2. *A.L. Castelhano, H. Dong, M.C.T. Fyfe, L.S. Gardner, Yu. Kamikozawa, S. Kurabayashi, M. Nawano, R. Ohashi, M.J. Procter, Li Qiu, Ch.M. Rasamison, K.L. Schofield, V.K. Shah, K. Ueta, G.M. Williams, D. Witter, K. Yasuda* // Glucokinase-activating ureas – Bioorg. Med. Chem. Lett., 2005, Vol. 15, №5, P. 1501−1504.
3. *D. Johnson, R.M. Shepherd, D. Gill, T. Gorman, D.M. Smith, M.J. Dunne* // Glucokinase activators: molecular tools for studying the physiology of insulin-secreting cells – Biochem. Soc. Trans., 2007, Vol. 35, part 5, P. 1208−1210.
4. *B. Leighton, A. Atkinson, M.P. Coghlan* //Small molecule glucokinase activators as novel anti-diabetic agents – Biochem. Soc. Trans., 2005, Vol. 33, part 2, P. 371−374.
5. *T.J.A. Eving, S. Makino, A.G. Skillman, I.D. Kuntz* // DOCK 4.0: Search strategies for automatied molecular docking of flexible molecule databases – J. Comput. Aided. Mol. Des., 2001, Vol. 15, P. 411–428; DOCK 6.4, http://dock.compbio.ucsf.edu/
6. *B. Stanovnik, M. Tišler, V. Colob, I. Huala, O. Nicolič* // Heteroacyl azides as acylating agents for aromatic or heteroaromatic amines – J. Heterocycles, 1980, Vol. 1, P. 733–736.

GLUCOKINASE ACTIVATORS BASED ON DERIVATIVES OF 2-PYRIDINYLUREA

Tarasova I.V., Semenov A.V., Petrov P.S., Khramov V.S., Semenova E.V.

Mordovian State University named after N.P. Ogarev, Saransk, Russia
e-mail: tarasova_iv_mrsu@mail.ru

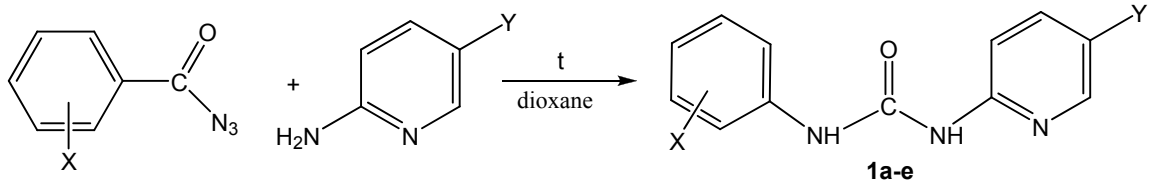
Type 2 diabetes is a widespread disease accompanied by high morbidity and mortality among the patients. Current therapies do not achieve adequate control of the blood glucose level, and there is a growing need for novel drugs with improved efficacy to treat this disease.

The development of synthetic glucokinase activators – an enzyme involved in the key stage of glycolysis – is one of the current trends in the treatment of type 2 diabetes. Analysis of the structures of the compounds described in the literature as glucokinase activators, shows that a key role in the binding of the enzyme in the allosteric site is playing the presence of several heteroatoms able to form the hydrogen bonds and to join other intermolecular interactions. The derivatives of pyrimidine, pyridine and thiazole containing carbamate or urea fragments in its composition are using as potential glucokinase activators most often [1–4].

To identify potential glucokinase activators, we performed a virtual screening of the series of heterocyclic structures containing urea fragment in its composition. The analysis was performed by flexible ligand docking using a software package DOCK 6.4 [5]. Docking procedure was performed using the incremenal construction algorithm. The scoring functions based on the AMBER force field were used for the ranking of ligands. The number of derivatives of 2-pyridinylurea (**1a-e**) satisfying the criteria of steric match and having the best value of the grid score was selected as leaders after the visual filter the results of screening.

The main synthetic approach for obtaining the lead compounds (asymmetric disubstituted urea derivatives) reduces to the interaction of primary amines with isocyanates. However, isocyanates are arduous and highly toxic compounds, therefore appropriate to use their synthetic equivalents in preparative reactions, such as acylazides, which easily obtained from the corresponding carboxylic acids.

In this regard, the synthesis of target compounds was carried out by reacting of 2-aminopyridines with substituted phenyl isocyanates, generated *in situ* from the corresponding acylazides by Curtius rearrangement by boiling them in dioxane for 1-1,5 h [6]:



1a-e

X, Y = H (**a**); X = *m*-NO_2, Y = H (**b**);
X = *p*-NO_2, Y = H (**c**); X = *m*-NO_2, Y = NO_2 (**d**);
X = *p*-NO_2, Y = NO_2 (**e**)

The yield of compound **1a-e** after purification by crystallization from aqueous ethanol was accounted for more than 80%. Their structure was confirmed reliably by IR, ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopy.

Thus, ureas **1a-e** can serve as a basis for creating new drugs from the class of glucokinase activators after the biological testing for the treatment of socially significant diseases – type 2 diabetes.

References:

1. *K. Kamata, M. Mitsuya, T. Nishimura, J. Eiki, Y. Nagata* // Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase – Structure, 2004, Vol. 12, P. 429−438.
2. *A.L. Castelhano, H. Dong, M.C.T. Fyfe, L.S. Gardner, Yu. Kamikozawa, S. Kurabayashi, M. Nawano, R. Ohashi, M.J. Procter, Li Qiu, Ch.M. Rasamison, K.L. Schofield, V.K. Shah, K. Ueta, G.M. Williams, D. Witter, K. Yasuda* // Glucokinase-activating ureas – Bioorg. Med. Chem. Lett., 2005, Vol. 15, №5, P. 1501−1504.
3. *D. Johnson, R.M. Shepherd, D. Gill, T. Gorman, D.M. Smith, M.J. Dunne* // Glucokinase activators: molecular tools for studying the physiology of insulin-secreting cells – Biochem. Soc. Trans., 2007, Vol. 35, part 5, P. 1208−1210.
4. *B. Leighton, A. Atkinson, M.P. Coghlan* //Small molecule glucokinase activators as novel anti-diabetic agents – Biochem. Soc. Trans., 2005, Vol. 33, part 2, P. 371−374.
5. *T.J.A. Eving, S. Makino, A.G. Skillman, I.D. Kuntz* // DOCK 4.0: Search strategies for automatied molecular docking of flexible molecule databases – J. Comput. Aided. Mol. Des., 2001, Vol. 15, P. 411–428; DOCK 6.4, http://dock.compbio.ucsf.edu/
6. *B. Stanovnik, M. Tišler, V. Colob, I. Huala, O. Nicolič* // Heteroacyl azides as acylating agents for aromatic or heteroaromatic amines – J. Heterocycles, 1980, Vol. 1, P. 733–736.

СИНТЕЗ И ПРИМЕНЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

[1,2]Татульченков М.Ю., [2]Набиуллин А.Р., [2]Шманай В.В., [3]Жавнерко Г.К.

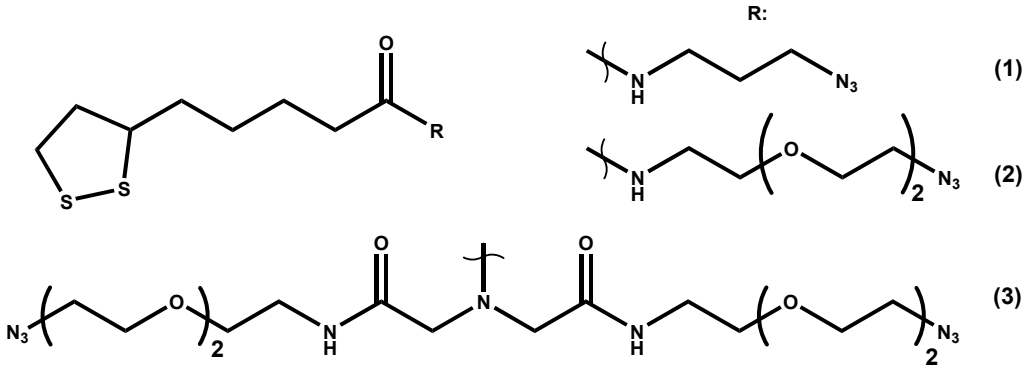
[1]БГУ, Минск, Беларусь
[2]ИФОХ НАН Беларуси, Минск, Беларусь
[3]ИХНМ НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: tatulmax@yandex.ru

В современной медицине всё большее применение находят конъюгаты золотых наночастиц с биомолекулами. Синтез подобных конъюгатов требует получения специальных бифункциональных линкеров, несущих как минимум одну якорную (тиольную, либо дисульфидную группу) и функциональную группу, пригодную для конъюгирования с биомолекулой. Немаловажным условием является биосовместимость линкера или фрагментов его структуры.

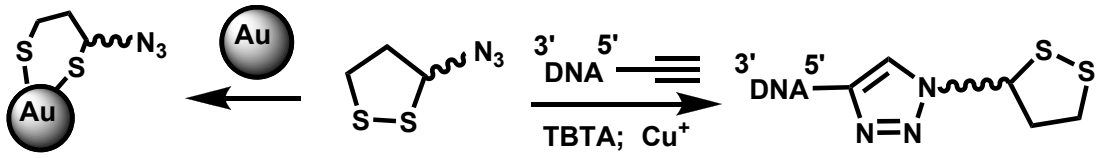
Липоевая кислота – природное соединение, играющее важную роль в работе печени. Благодаря наличию дисульфидной группы в её структуре, липоевая кислота и её производные являются перспективными линкерами для синтеза биоконъюгатов.

Широкое применение для синтеза биоконъюгатов имеет реакция Хьюсгена–Мельдаля–Шарплесса (катализируемое Cu(I) циклоприсоединение азидов и алкинов), протекающая в мягких условиях, селективно и с высоким выходом. Для реализации данного превращения необходимо, чтобы в структуре линкера имелся терминальный алкин, либо азидная функция.

Нами были получены (3-азидопропил)амид липоевой кислоты (1), (8-азидо-3,6-диоксаоктил)амид липоевой кислоты (2) и разветвлённый линкер бис(((8-азидо-3,6-диоксаоктил)карбамоил)метил)амид липоевой кислоты (3).



Полученные реагенты использовались для модификации золотых наночастиц, а также олигонуклеотидов, содержащих 5'-концевую тройную связь.



Конъюгаты были выделены и охарактеризованы. Олигонуклеотиды, модифицированные производными липоевой, кислоты специфически иммобилизованы на поверхности золота, что было доказано снимками АСМ.

SYNTHESIS OF LIPOIC ACID DERIVATIVES AND APPLICATION OF THEM IN FUNCTIONALIZATION OF GOLD NANOPARTICLES AND OLIGONUCLEOTIDES

[1,2]Tatulchenkov M.Yu., [2]Nabiullin A.R., [2]Shmanai V.V., [3]Zhavnerko G.K.

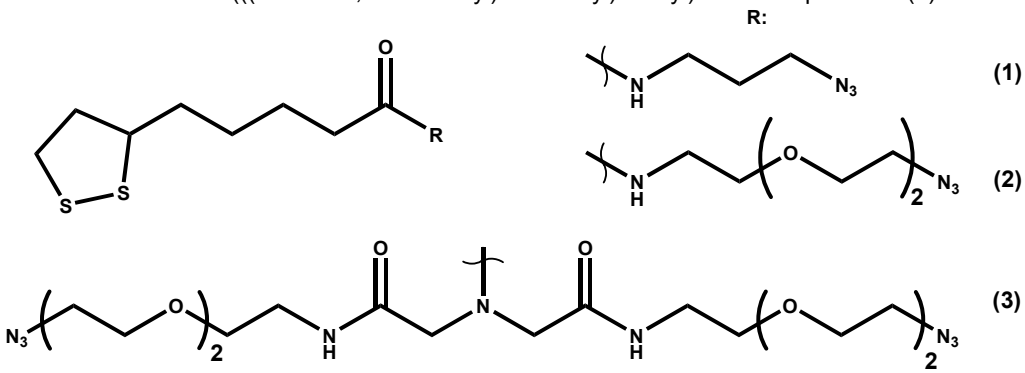
[1]Belarussian State University, Minsk, Belarus
[2]Institute of Physical Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[3]Institute of New Materials' Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: tatulmax@yandex.ru

Conjugates of gold nanoparticles with biomolecules play a significant role in modern medicine. Their synthesis requires special bifunctional linkers to be obtained. Linker molecule should possess at least one anchor (thiol or disulphide) and one functional group responsible for conjugation with biomolecules. Biocompatibility of the linker or its fragments is also of great importance.

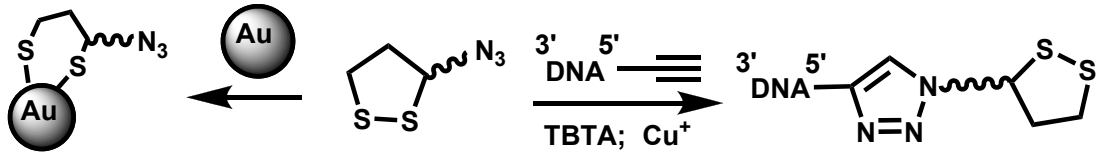
Lipoic acid is a natural compound which plays an important role in liver function. Due to the presence of the disulphide group in its structure, lipoic acid and its derivatives are potentially important as the linkers for bioconjugation.

The Huisgen–Meldal–Sharpless Reaction (the Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition) is widely used for bioconjugation because it is high-yield, selective and unpretentious. The corresponding linker should have the therminal alkyne or azide function.

We have synthesized the (3-azidopropyl)amide of lipoic acid (1); (8-azido-3,6-dioxaoctyl)amide of lipoic acid (2) and the branched linker bis(((8-azido-3,6-dioxaoctyl)carbamoyl)methyl)amide of lipoic acid (3).



These reagents were used for the functionalization of gold nanoparticles and 5'-alkyne-modified oligonucleotides.



The conjugates were purified and characterized. The lipoic acid-functionalized oligonucleotides were shown to bind specifically to the gold surface as proved by AFM images.

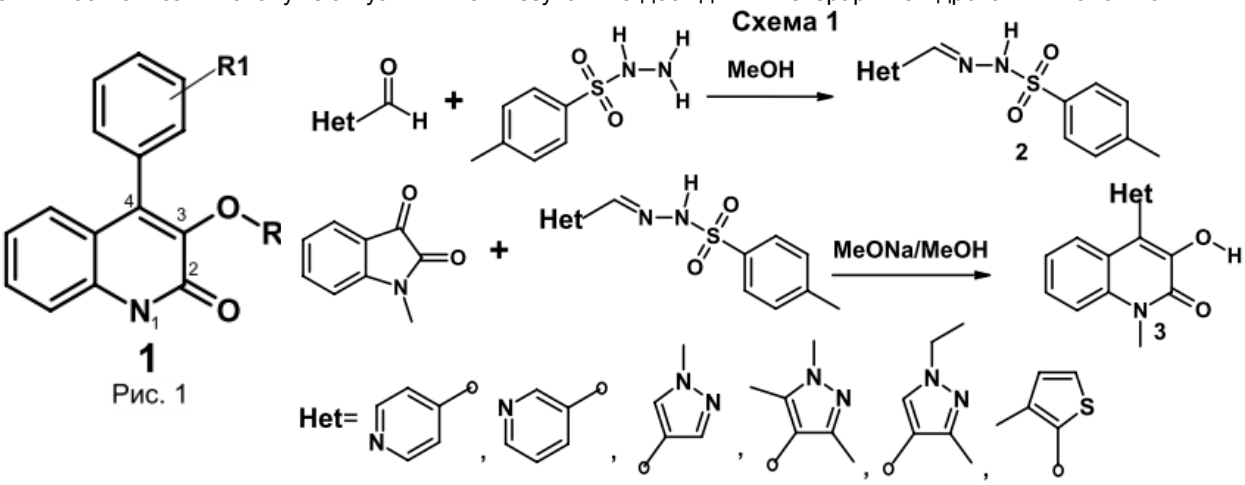
НОВІ 4-ГЕТЕРАРИЛ-3-ГІДРОКСИ-2-ХІНОЛОНИ — ГЕТЕРОЦИКЛІЧНІ АНАЛОГИ АЛКАЛОЇДУ ВІРИДИКАТІНУ

[1,2]Тимощук В.В., [1]Пивоваренко В.Г.

[1] Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
[2] Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАНУ, Київ, Україна
e- mail:tymvol@gmail.com

Відомо, що *Penicillium cyclopium*, окрім циклопенінових алкалоїдів бензодіазепінової будови, продукує 3-гідрокси-2-хінолони – віридикатін **1** (R=H, R1=H, Рис. 1) та віридикатол **1** (R=H, R1=3-OH, Рис. 1)**.** Нещодавно встановлено, що 3-О-метилвіридикатін **1** (R=Me, R1=H) інгібує реплікацію вірусу імунодефіциту людини, спричинену фактором некрозу пухлин (TNF-α), з IC_{50}=2,5μM [1]. Також виявлено, що 4-етоксаліл-3-гідрокси-2-хінолони є інгібіторами [^{3}H]-гліцин-зв'язуючого сайту NMDA-рецептора, а 4-Арил-3-гідрокси-2-хінолони відкривають кальцій-залежні калієві канали великої провідності (*Maxi-K* або *BK-канали)* і дають змогу використовувати ці речовини в лікуванні розладів, пов'язаних із залежними захворюваннями (напр. ішемія, конвульсії, астма та інші) [2].

Серед синтезованих та виділених 3-гідрокси-2-хінолонів практично не представлені аналоги з гетероциклічними замісниками в четвертому положенні. Відповідно до широкого спектру біологічної активності описаних сполук є актуальним синтезувати та дослідити 4-гетерарил-3-гідрокси-2-хінолони **3**.



Гетероциклічні альдегіди були переведені в тозилгідразони **2**, які взаємодіяли з N-метилізатином в умовах розкладу тозилгідразонів до діазосполук. Ступінь конверсії ізатину досягав 100%. У результаті були виділені цільові 3-гідрокси-2-хінолони **3** з піридиновими, піразольними та тієнільним замісниками (Схема 1). В окремих випадках отримали суміш **3** та ізомерного 4-гідрокси-3-гетерил-2-хінолону, яку було розділено на окремі складові шляхом перекристалізації. Було помічено, що синтезовані сполуки володіють набагато більшою розчинністю у воді в порівнянні з їх арильними аналогами.

Структура синтезованих сполук підтверджена даними ^{1}*H*-ЯМР спектроскопії, хроматографії та якісною реакцією з $FeCl_3$ (синьо-зелене забарвлення).

Література:

1. *N. Ribeiro, H. Tabaka, J. Peluso, L. Fetzer, C. Nebigil, S. Dumont, C.D. Muller, L. De´saubry* // Synthesis of 3-O-methylviridicatin analogues with improved anti-TNF-a properties - Bioorg. Med. Chem. Lett., 2007, т. 17, с. 5523–5524
2. *S.-Y. Sit, F. J. Ehrgott, J. Gao, N. A. Meanwell* // 3-Hydroxy-quinolin-2-ones: Inhibitors of [^{3}H]-glycine binding to the site associated with the NMDA receptor - Bioorg. Med. Chem. Lett., 1996, N 6, с. 499-504; б) S.-Y. Sit,; N. A. Meanwell // Патент WO 98/23273, опубліковано 04.06.98, Wallingford, US;

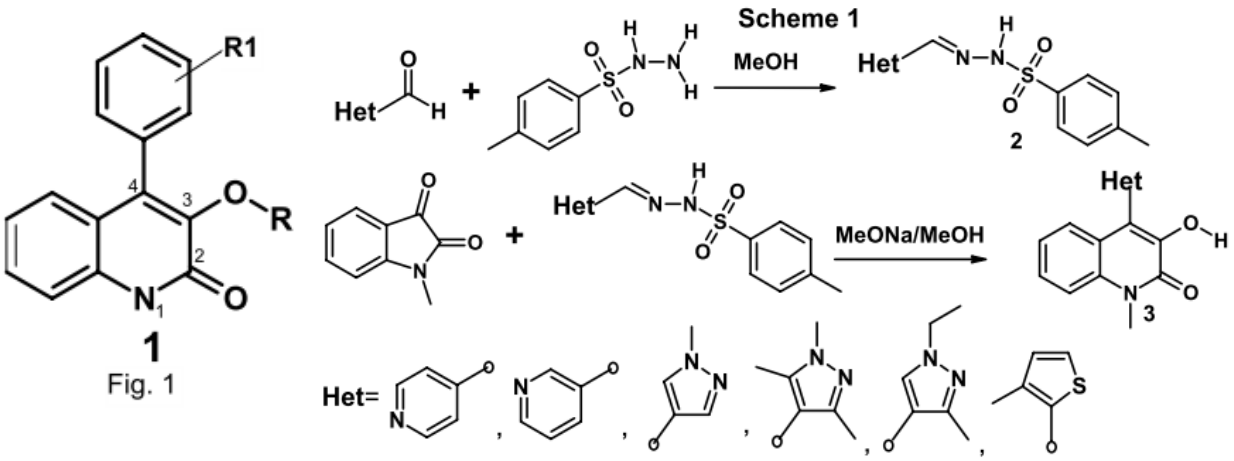
NEW 4-HETERARYL-3-HYDROXY-2-QUINOLONES - HETEROCYCLIC ANALOGUES OF ALKALOID VIRIDICATIN

[1, 2]*Tymoschuk V.V.*, [1]*Pivovarenko V.G.*

[1] Kyiv National Taras Shevchenko University, Kyiv, Ukraine
[2] Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of NASU, Kyiv, Ukraine
e-mail: tymvol@gmail.com

It is known that *Penicillium cyclopium*, except cyclopenins alkaloids benzodiazepine structure, produces 3-hydroxy-2-quinolones - viridicatin **1** (R = H, R1 = H, Fig. 1) and viridicatol **1** (R = H, R1 = 3-OH, Fig. 1). Recently shown that 3-*O*-metylviridicatin **1** (R = Me, R1 = H) inhibits the replication of human immunodeficiency virus (HIV) induced by tumor necrosis factor (TNF-□) with an IC 50 of 2.5 μM [1]. Also found that 4-etoxalyl-3-hydroxy-2-quinolones are inhibitors of [^{3}H]-glycine binding to the site associated with the NMDA receptor, and 4-aryl-3-hydroxy-2-quinolones are openers of the large conductance calcium-activated potassium channels of large conductance (Maxi-K or BK-channels) and useful in the treatment of disorders associated with dependent diseases (eg ischemia, convulsions, asthma and others) [2].

Among the synthesized and isolated 3-hydroxy-2-quinolones practically not represented analogues with heterocyclic substituents in the fourth position. According to a broad spectrum of biological activity described compounds is important to synthesize and study 4-heteraryl-3-hydroxy-2-quinolones **3**.



Heterocyclic aldehydes were converted into tosilhidrazones **2**, which interacted with the N-metylisatin in a reaction conditions deposition tosilhidrazones to *diazo substances***.** The degree of isatin conversion reached 100%. As a result, were isolated target 3-hydroxy-2-quinolones **3** with piridines, pirazoles and thienyl substituents (Scheme 1). In some cases it was a mixture of isomeric **3** and 4-hydroxy-3-heteryl-2-quinolones, which was divided into separate components by recrystallization. It was observed that the synthesized compounds have greater solubility in water in comparison with their aryl analogues.

The structure of synthesized compounds was confirmed with ^{1}H-NMR spectroscopy, chromatography and qualitative reaction with $FeCl_3$ (blue-green color).

References:

1. *N. Ribeiro, H. Tabaka, J. Peluso, L. Fetzer, C. Nebigil, S. Dumont, C.D. Muller, L. De´saubry* // Synthesis of 3-O-methylviridicatin analogues with improved anti-TNF-a properties - Bioorg. Med. Chem. Lett., 2007, т. 17, с. 5523–5524
2. *S.-Y. Sit, F. J. Ehrgott, J. Gao, N. A. Meanwell* // 3-Hydroxy-quinolin-2-ones: Inhibitors of [^{3}H]-glycine binding to the site associated with the NMDA receptor - Bioorg. Med. Chem. Lett., 1996, N 6, с. 499-504; б) S.-Y. Sit,; N. A. Meanwell // Patent WO 98/23273, Publication Date 04.06.98, Wallingford, US;

КОМПОЗИЦИОННЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, СОДЕРЖАЩИЕ TiO_2 и Ag, КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ВЫСОКОАКТИВНЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ И САМООЧИЩАЮЩИЕСЯ ПОКРЫТИЯ

Толстов А.Л., Матюшов В.Ф., Лебедев Е.В.

Институт химии высокомолекулярных соединений НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: tolstov.aleksandr@rambler.ru

Современное развитие и тесная взаимосвязь химии и материаловедения является движущей силой в разработке и изготовлении материалов с комплексом разнообразных полезных, а, зачастую, и уникальных свойств, что дает возможность их дальнейшего широкого применения в различных областях промышленности и в быту. Это также относится к разработке антимикробных и самоочищающихся композиционных материалов, перспективность которых обусловлена технологичностью изготовления, дешевизной, возможностью широкого использования. К таким материалам относятся композиты на основе нанокристаллического диоксида титана, TiO_2 [1], серебра в ионной (Ag^+) или высокодисперсной (наночастицы) форме (Ag-НЧ) [2], а также смешанные, TiO_2/Ag системы [3].

Активность материалов на основе TiO_2 связана с поглощением кванта света (УФ, видимый), что в присутствии O_2 и H_2O приводит к образованию высокоактивных ионов и радикалов (O_2^-, OH*), вызывающих гибель микроорганизмов и деструкцию органических веществ до низкомолекулярных составляющих (CO_2, H_2O и др.). Антибактериальное действие Ag^+ и Ag-НЧ агентов связано с нарушением клеточных процессов микроорганизмов, что приводит к их быстрой гибели.

Разработанный метод получения высокопористых покрытий на основе нанокристаллического TiO_2 (см. рис. 1А), преимуществом которого является использование дешевых компонентов, простой аппаратуры и экологическая безопасность процесса, позволяет получать высокоэффективные фотоактивные покрытия с антибактериальными свойствами и способностью к самоочистке.

Другой тип материалов с антимикробными свойствами – полимерные композиты, содержащие Ag^+ и/или Ag-НЧ (см. рис. 1Б). Применение разнообразных подходов современной химии позволило получить стабильные высокопористые полимерные системы, в состав которых входит как ионы серебра, так и Ag-НЧ различных форм (сферы, призмы, стержни, иголки, трубки) и размеров (от 3-4 до 150-250 нм). Носителем антибактериального агента может служить как полимерная матрица, так и инертный высокодисперсный полимерный наполнитель с поверхностным активным слоем. При этом важным критерием эффективности материала является контролируемый процесс выделения (в течение продолжительного времени в необходимой концентрации) активной составляющей во внешнюю среду.

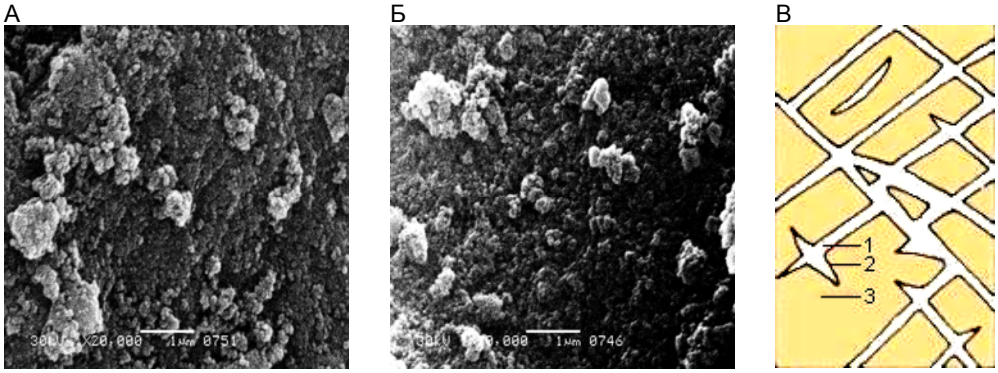


Рис. 1. СЕМ микрофотографии поверхности TiO_2- (А) и Ag-содержащих (Б) композитов, и общая схема внутренней структуры (В) высокопористых образцов (1 – поры; 2 – активный слой; 3 - носитель).

Результатом работы в представленных направлениях может служить создание лаков и эмалей для эффективного использования в качестве покрытий с антибактериальными свойствами и способностью к самоочистке для оборудования пищевой и фармацевтической промышленности, систем очистки воздуха и воды, рабочих поверхностей в медицинских учреждениях, местах массового скопления людей и др.

Литература:

1. *X. Chen, S.S. Mao.* // Titanium dioxide nanomaterials: Synthesis, properties, modifications and applications - Chem. Rev., 2007, v. 107, p. 2891-2959.
2. *M. Guan, L. Ren, T. Wu, L.-P. Sun, L.-R. Li, Q.-Q. Zhang.* // Potential wound dressing with improved antimicrobial property – J. Appl. Polym. Sci., 2007, v. 105, p. 1679-1686.
3. *V.K. Sharma, R.A. Yngard, Y. Lin.* // Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities – Adv. Colloid and Interface Sci., 2009, v. 145, p. 83-96.
4. *D. Guin, S.V. Manorama, J.N.L. Latha, S. Singh.* // Photoreduction of silver on bare and colloidal TiO_2 nanoparticles/nanotubes: Synthesis, characterization, and tested for antibacterial outcome – J. Phys. Chem. C, 2007, v. 111, p. 13393-13397.

TITANIUM DIOXIDE AND SILVER-CONTAINING COMPOSITE POLYMER MATERIALS FOR HIGHLY EFFICIENT ANTIMICROBIAL AND SELF-CLEANING COATINGS

Tolstov A.L., Matyushov V.F., Lebedev E.V.

Institute of Macromolecular Chemistry of the NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: tolstov.aleksandr@rambler.ru

Recently a progress in chemistry and material science and its interconnection as well is a driving force in elaboration and manufacturing various materials having a complex of useful and unique properties. It is give a possibility for its applying in different fields of industry and for civil uses. There is no doubt that this idea is also concerned to the development of antimicrobial and self-cleaning composite materials that are very perspective due to high adaptability to the manufacture, low cost and wide application fields. The most interesting materials are nanocrystalline TiO_2 (NC-TiO_2) based composites [1], ionic (Ag^+) and nanoparticulate (NP-Ag) silver containing composites [2] as well as mixed type TiO_2/Ag compositions [3].

As known the activity of NC-TiO_2 based materials is due an absorption of photons (UV, visible) resulted in formation of highly reactive ions and radicals (O_2^-, OH*) in the presence of O_2 and H_2O that directly kill the microorganisms and induce a deep degradation of organics to low-molecular compounds (CO_2, H_2O etc.). Antibacterial activity of silver connects to disordering of cell processes that leads to death of bacteria.

In the present work a new ecological friendly method of preparation of highly efficient photoactive NC-TiO_2 based composite coatings with antimicrobial and self-cleaning properties (Fig. 1A), that is characterized by using cheap precursors and simple equipment has been developed and optimized.

Another type of the antibacterial coatings is Ag^+- and NP-Ag containing polymer composites (Fig. 1Б). Applying different modern chemical approaches is allowed to prepare a stable polymer systems consist of as ionic as well as nanoparticulate silver advanced antibacterials of different shapes (spheres, prisms, rods, needles, tubes) and sizes (from 3-4 to 150-250 nm). As the carriers the many types of polymer matrices or inert fine fillers with active surface layer could be provided. As this takes place, an important factor of antimicrobial efficiency of these materials is a controlled release of active agent into environment.

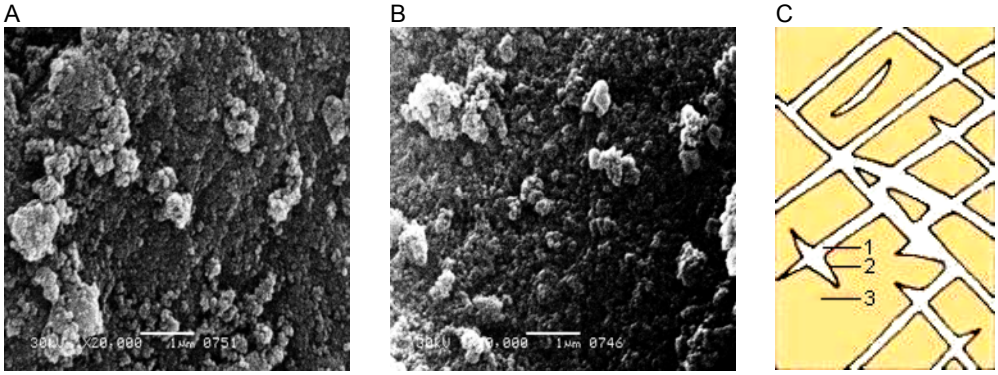


Figure 1. SEM images of the active surface of TiO_2- (A) и Ag-containing (B) composites, and the scheme of internal structure of the samples (C) (1 – pores; 2 – active layer; 3 - carrier).

Obtained results could be realized in producing lacquers and enamels for applying as antibacterial and self-cleaning coatings for equipment of food and pharmaceutical industry, air- and water-cleaning devices, for medical and civil institutions, etc.

References:

1. *X. Chen, S.S. Mao.* // Titanium dioxide nanomaterials: Synthesis, properties, modifications and applications - Chem. Rev., 2007, v. 107, p. 2891-2959.
2. *M. Guan, L. Ren, T. Wu, L.-P. Sun, L.-R. Li, Q.-Q. Zhang.* // Potential wound dressing with improved antimicrobial property – J. Appl. Polym. Sci., 2007, v. 105, p. 1679-1686.
3. *V.K. Sharma, R.A. Yngard, Y. Lin.* // Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities – Adv. Colloid and Interface Sci., 2009, v. 145, p. 83-96.
4. *D. Guin, S.V. Manorama, J.N.L. Latha, S. Singh.* // Photoreduction of silver on bare and colloidal TiO_2 nanoparticles/nanotubes: Synthesis, characterization, and tested for antibacterial outcome – J. Phys. Chem. C, 2007, v. 111, p. 13393-13397.

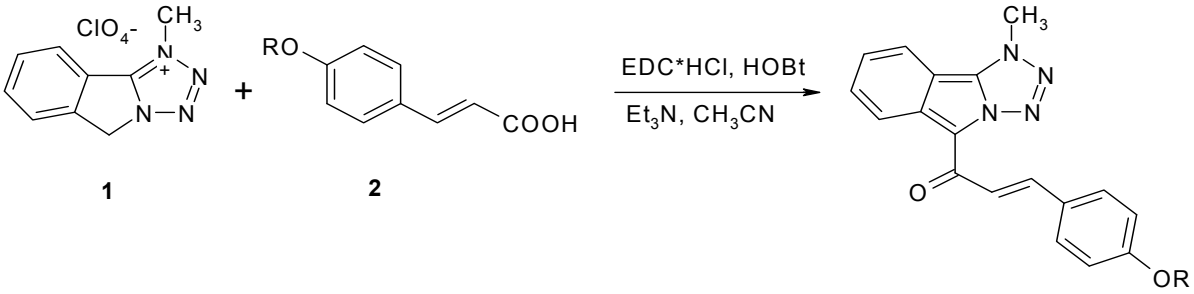
РЕАКЦІЯ 4-АЛКОКСИКОРИЧНОЇ КИСЛОТИ ТА ТЕТРАЗОЛО[5,1-А]ІЗОІНДОЛУ

[1]Єгорова Т.В., [1]Войтенко З.В., [2] Бальтас М., [2]Мазьєр М.Р., [2]Де П.

[1]Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
e-mail: z_voitenko@univ.kiev.ua
[2]Університет Поля Сабатьє, Тулуза, Франція

Фенольні сполуки — біологічно активні речовини, що широко поширені серед харчових рослин. Серед них гідроксильні похідні коричної кислоти є природними продуктами, одержуваними через дезамінування фенілаланіну; вони є важливими складовими біохімічних шляхів в рослинах, що ведуть до полімеру лігніну — другого найбільш поширеного біополімеру після целюлози — в результаті окиснювальної полімеризації трьох .гідроксикоричних спиртів, тобто р-кумарилового, коніферилового , синапілового спиртів. В останні роки фенольні сполуки привернули велику увагу завдяки їх антиоксидантним, протизапальним, антимутагенним та протираковим властивостям. Антимутагенні та протипухлинні властивості цих сполук пов'язані з їх здатністю попереджувати окиснювальне пошкодження в природних умовах очищення активних форм кисню. Вважається, що вони таким чином попереджують клітинну проліферацію, апоптоз та пошкодження ферментів репарації ДНК або пошкодження полімеразної ДНК. Фрагмент коричної кислоти також присутній серед різноманітних метаболітів фенілпропаноїдів біосинтетичного походження. Ті, що містять сесквітерпенові, монотерпенові та ізопентенові ланцюгі, які приєднані до 4-гідроксильної групи, представляють досить раритетну групу природних продуктів. Серед них етиловий естер 3(4`-геранілокси-3`-метоксифеніл)-2-*транс*-пропенової кислоти, що належить до сімейства рутових, показав наявність хемопревентивного антиракового ефекту та інших ефектів, що пов'язані з раковим ростом [1]. Похідні тетразолоізоіндолу також продемонстрували широкий спектр біологічної активності [2]. Метою нашої роботи було поєднання цих фрагментів в одну молекулу.

Реакцію проводили в умовах, описаних в роботі [1], одержано нові сполуки **3** (R=CH_3, CF_3).



1 **2** **3**

Дякуємо українсько-французькій програмі "ДНІПРО" (№ 19739QB (Франція), № М/90-2009 (Україна)) за фінансову підтримку.

Література:

1.*P. De, M. Baltas, D. Lamoral-Theys, C. Bruyere, R. Kiss, F. Bedos-Beval, N. Saffon.* // Synthesis and anticancer activity evaluayion of 2(4-alkoxyphenyl)cyclopropyl hydrazides and triazolo phthalazines - Bioorg. Med. Chem., 2010, v.18, p. 2537-2549.
2.*Z.V. Voitenko, T.V. Yegorova, V.O. Kovtunenko*. // Triazolo- and tetrazoloisoindoles (Review) – Chem. Heterocycl. Compounds (translated from Russian), 2002, v. 423, № 9, p. 1171-1193.

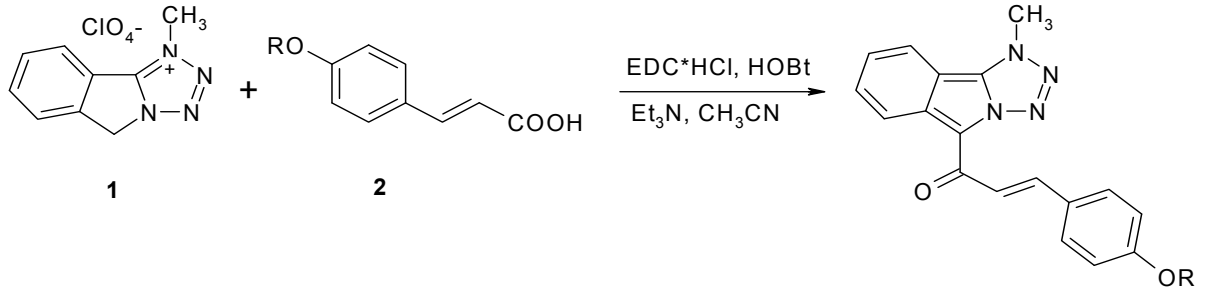
REACTION OF 4-ALKOXYCINNAMIC ACID AND TETRAZOLO[5,1-A]ISOINDOLE

[1] Yegorova T.V., [1]Voitenko Z.V., [2] Baltas M., [2] Mazieres M.R., [2]De P.

[1]Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
e-mail: z_voitenko@univ.kiev.ua
[2]Universite Paul Sabatier, Toulouse, France

Phenolic compounds are bioactive substances with a widespread occurrence in food plants. Among them, the hydroxyl cinnamic acid family are natural products arising from the deamination of the phenyl alanine; they are important constituents in the biochemical pathway in plants leading to the lignin polymer, the second most abundant biopolymer after cellulose, resulting from the oxidative polymerization of the three hydroxycinnamoyl alcohols, that is, *p*-coumaryl, coniferyl, sinapyl alcohols. In recent years the phenolic compounds have attracted much attention due to their antioxidative, anti-inflammatory, antimutagenic and anticarcinogenic properties. The antimutagenic and antitumor properties of these compounds are related to their ability to prevent oxidative damage in vivo by scavenging reactive oxygen species. It is considered that they thus prevent cellular proliferation, apoptosis and damage to DNA repair enzymes or damage to DNA polymeraze. The cinnamoyl functionality is also present in a variety of secondary metabolites of phenylpropanoid biosynthetic origin. Those containing a sesquiterpenyl, monoterpenyl and isopentenyl chains attached to a 4-hydroxy group represent quite a rare group of naturalproducts. Among these the ethyl ester of 3(4`-geranyloxy-3`-methoxyphenyl)-2-*trans* propenoic acid belonging to the family of Rutaceae showed a cancer chemopreventive effect and other effects closely related to cancer growth [1]. Tetrazoloisoindole derivatives have also demonstrated the wide spectrum of biological activity [2]. So the purpose of our work was to join these moieties in one molecule.

Reaction was carried out using previously described conditions [1] with a new compound **3** obtained (R=CH_3, CF_3).



1 **2** **3**

We are greatfull to Franco-Ukrainian Program "DNIPRO" (ref. 19739QB (Fr.), ref. M/90-2009 (Ukr.)) for financial support.

References:

1.*P. De, M. Baltas, D. Lamoral-Theys, C. Bruyere, R. Kiss, F. Bedos-Beval, N. Saffon.* // Synthesis and anticancer activity evaluayion of 2(4-alkoxyphenyl)cyclopropyl hydrazides and triazolo phthalazines - Bioorg. Med. Chem., 2010, v.18, p. 2537-2549.
2.*Z.V. Voitenko, T.V. Yegorova, V.O. Kovtunenko.* // Triazolo- and tetrazoloisoindoles (Review) – Chem. Heterocycl. Compounds (translated from Russian), 2002, v. 423, № 9, p. 1171-1193.

ПОЛУЧЕНИЕ КОНЪЮГАТОВ АНТИТЕЛ С КОНТРОЛИРУЕМОЙ ЗАГРУЗКОЙ ГАПТЕНА ПРИ ПОМОЩИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БИФУНКЦИОНАЛЬНОГО ЛИНКЕРА

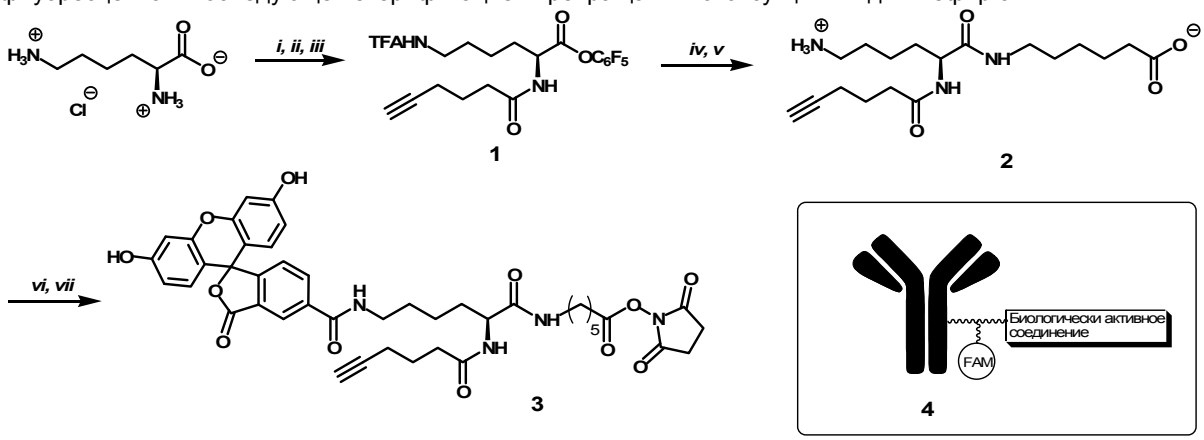
[1,2]Улащик Е.А., [2]Квач М.В., [2]Зубенко Ю.С., [2]Шманай В.В.

[1] Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
[2] Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: shmanai@ifoch.bas-net.by

Конъюгаты антител с противораковыми соединениями находят все большее применение в терапии раковых опухолей [1-3]. Однако одной из проблем получения этих конъюгатов является определение соотношения антитело/лиганд. В случае, когда лиганд не имеет специфического поглощения в ультрафиолетовой/видимой области, определение соотношения может быть проведено только косвенными методами.

Нами разработан универсальный подход к получению модифицированных антител, содержащих заданное количество функциональных групп (терминальных алкинов), которые могут быть модифицированы биологически активными соединениями с высокой эффективностью по реакции [2+3] циклоприсоединения. Подход основан на модификации антител флуоресцентным бифункциональным линкером **3**, содержащим краситель и терминальную алкиновую функциональную группу, с определением соотношения антитело/гаптен по специфическим поглощениям на 280 нм и 495 нм, и дальнейшей модификацией терминальной тройной связи по реакции медь-катализируемого [2+3] циклоприсоединения.

Синтез бифункционального линкера **3** осуществляли исходя из природного L-лизина. За пять стадий собирали углеродный скелет линкера **2**, который ацилированием аминогруппы карбоксипроизводным флуоресцеина и последующей этерификацией превращали в оксисукцинимидный эфир **3**.



i, CF_3CO_2Et, EtOH; *ii,* пентафторфениловый эфир 5-гексиновой кислоты, ДМФ; *iii*, C_6F_5OH, ДЦК; *iv*, 6-аминокапроновая кислота, ДМФ; *v*, NaOH, H_2O; *vi*, 5-FAM-NHS, ДМФ; *vii*, *N*-гидроксисукцинимид, ДЦК.

Полученное соединение **3** использовали для функционализации человеческих иммуноглобулинов (IgG). Соотношение антитело/гаптен в диапазоне 1:1 - 1:10 в модифицированных IgG было определено с помощью спектроскопии ультрафиолетовой и видимой области. Дальнейшее [2+3] циклоприсоединение азидов антиопухолевых, антивирусных или антимикробных биологически активных соединений к модифицированным IgG приводит к модельным конъюгатам **4**.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства образования Германии BMBF 09-002

Литература:

1. *Sh. Quiles, K.P. Raisch, L.L. Sanford, J.A. Bonner, A. Safavy*. // Synthesis and Preliminary Biological Evaluation of High-Drug-Load Paclitaxel-Antibody Conjugates for Tumor-Targeted Chemotherapy - J. Med. Chem., 2010, V. 53, № 2, p. 586–594
2. *H.M. Yang, R.A. Reisfeld.* // Doxorubicin conjugated with a monoclonal antibody directed to a human melanoma-associated proteoglycan suppresses the growth of established tumor xenografts in nude mice – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, V. 85, № 4, p. 1189-1193
3. *B. Hughes.* // Antibody–drug conjugates for cancer: poised to deliver? - Nature Rev. Drug Discovery, 2010, V. 9, p. 665-667

SYNTHESIS OF ANTIBODIES CONJUGATES WITH CONTROLLED LOAD OF HAPTENES BY THE USE OF FLUORESCENT BIFUNCTIONAL LINKER

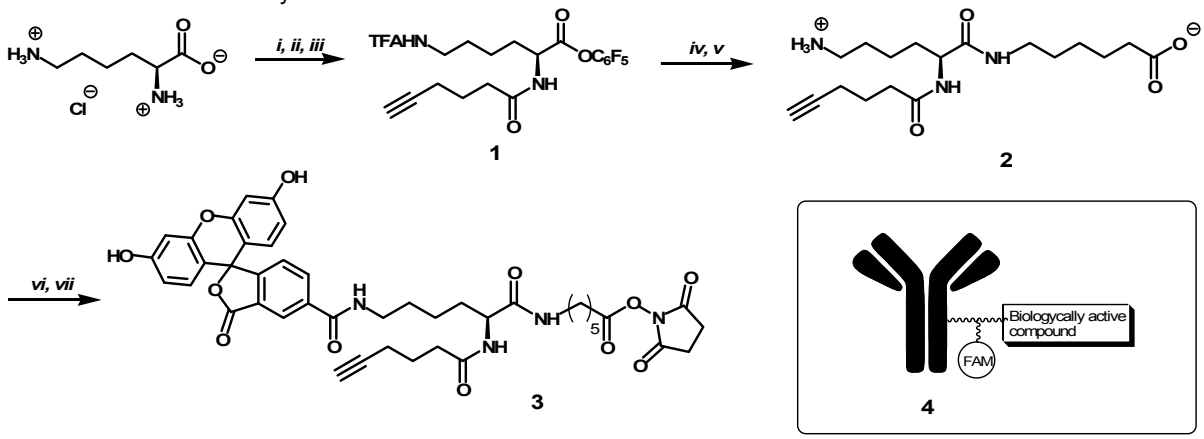
[1,2]Ulaschick E.A., [2]Kvach M.V., [2]Zubenko Y.S., [2]Shmanai V.V.

[1]Belarusian State University, Minsk, Belarus.
[2]Institute of Physical Organic Chemistry NASB, Minsk, Belarus
e-mail: shmanai@ifoch.bas-net.by

The conjugates of antibodies with the anticancer compounds are widely used in cancer therapy [1-3]. However, a determination of the antibody to ligand ratio is one of the common problem during the preparation of such conjugates. In case if a ligand has no specific UV-visible absorption this ratio can be measured only by indirect methods.

We have developed the universal approach for the obtaining of the modified antibodies containing specific amount of the terminal alkyne moieties which can be further modified by the biologically active compounds using [2+3] cycloaddition reaction with a high efficiency. This approach is based on the modification of antibodies by the fluorescent bifunctional linker, which contains a dye residue and a terminal alkyne functional group. The antigen to hapten ratio was determined by the specific absorption at 280 and 495 nm. Then the terminal triple bond was modified by a biologically active compound having an azide group using the copper catalyzed [2+3] cycloaddition reaction.

The synthesis of the bifunctional linker **3** was started from the natural L-lysine. The scaffold of linker **2** was obtained in five steps. The amino group of the linker **2** was acylated by a carboxyfluorescein derivative which was further converted to the oxysuccinimide ester **3**.



i, CF_3CO_2Et, EtOH; *ii,* 5-hexynoic acid pentafluorophenyl ester, DMF; *iii*, C_6F_5OH, DCC; *iv*, 6-aminohexanoic acid, DMF; *v*, NaOH, H_2O; *vi*, 5-FAM-NHS, DMF; *vii*, *N*-hydroxysuccinimide, DCC.

Obtained compound **3** was used for the functionalization of the human IgG. An antibody to hapten ratio (from 1:1 to 1:10) in the modified IgGs was easily determined by the UV-visible spectroscopy. Further [2+3] cycloaddition reaction of the modified IgGs with the antitumor, antivirus or antimicrobial biologically active compounds gives the model conjugates **4**.

This work was supported by a grant of Ministry of Education of German BMBF 09-002

References:

1. *Sh. Quiles, K.P. Raisch, L.L. Sanford, J.A. Bonner, A. Safavy*. // Synthesis and Preliminary Biological Evaluation of High-Drug-Load Paclitaxel-Antibody Conjugates for Tumor-Targeted Chemotherapy - J. Med. Chem., 2010, V. 53, № 2, p. 586–594
2. *H.M. Yang, R.A. Reisfeld*. // Doxorubicin conjugated with a monoclonal antibody directed to a human melanoma-associated proteoglycan suppresses the growth of established tumor xenografts in nude mice – Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, V. 85, № 4, p. 1189-1193
3. *B. Hughes*. // Antibody–drug conjugates for cancer: poised to deliver? - Nature Rev. Drug Discovery, 2010, V. 9, p. 665-667

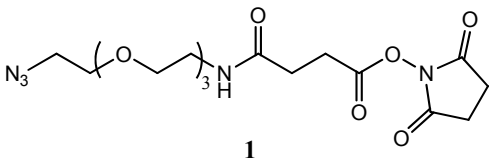
МЕТОДЫ КОНТРОЛИРУЕМОГО ВВЕДЕНИЯ АЗИДНЫХ ГРУПП В БЕЛКИ

Фомич М.А., Квач М.В., Шманай В.В.

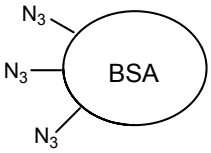
Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: shmanai@ifoch.bas-net.by

Синтез модифицированных белков и белковых конъюгатов является важной задачей с учетом высокой потребности медицины и молекулярной биологии в подобных продуктах. Поскольку большинство существующих методов модификации биомолекул основано на статистическом взаимодействии, нами разрабатываются методы контролируемого введения реакционноспособных групп в молекулы белков. Известно, что синтез белков, меченных азидными группами, открывает путь к контролируемому получению сложных биоконъюгатов методом азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемого медью (I).

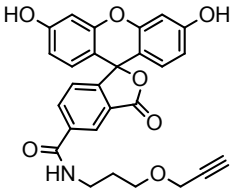
Нами проведена модификация бычьего сывороточного альбумина (BSA) азидными группами. Для этого синтезирован биосовместимый гидрофильный линкер **1** с азидной группой, который способен взаимодействовать с нуклеофильными центрами белка. После введения в реакцию белка и линкера **1** в различных мольных соотношениях азидомодифицированный белок **2** был выделен, введен во взаимодействие с ранее синтезированным нами алкиновым производным карбоксифлуоресцеина (FAM) **3** и охарактеризован методом спектроскопии в ультрафиолетовой и видимой области. По интенсивности поглощения составных частей полученных конъюгатов **4** была установлена зависимость между соотношением реагентов и числом входящих в белок азидных групп.



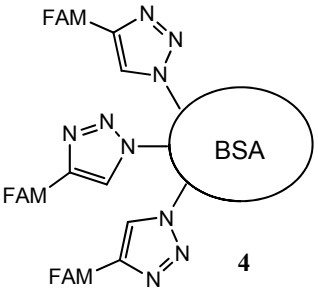
1



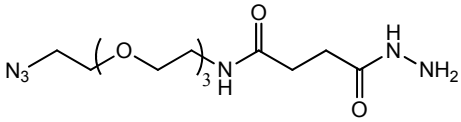
2



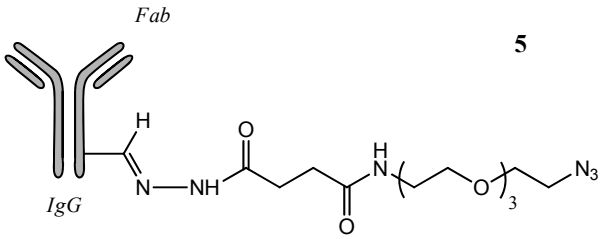
3



4



5



6

В том случае, когда важно сохранить биологическую активность белка, необходима его сайт-специфичная модификация. Для этих целей нами синтезирован линкер **5**, содержащий гидразидную функцию для модификации гликопротеинов, в том числе антител, по альдегидным группам, которые образуются в результате периодатного окисления входящих в состав белка углеводных остатков. Являясь высокоселективной, такая модификация не затрагивает вариабельные фрагменты (Fab), и позволяет полностью сохранить их антиген-связывающие свойства. Полученные азидопроизводные антител **6** можно дальше вводить в реакцию циклоприсоединения с алкинопроизводными ферментов, ДНК, красителей и лекарственных средств с целью получения конъюгатов, широко востребованных в различных биотехнологических приложениях.

Разработанные методы позволяют вводить в белок необходимое количество функциональных групп: от минимального с целью сохранения биологической активности для иммуноанализа до максимальной в случае использования модифицированных белков для получения иммуногенов.

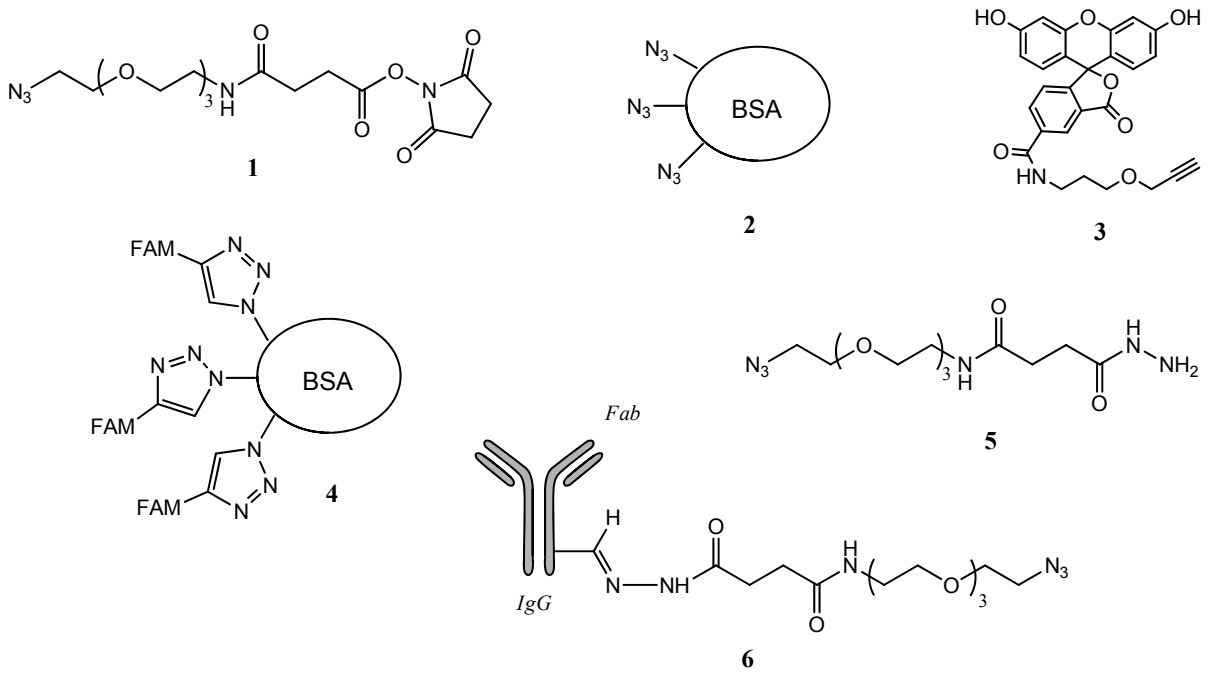
METHODS FOR CONTROLLED AZIDE-DERIVATIZATION OF PROTEINS

Fomich M.A., Kvach M.V., Shmanai V.V.

Institute of Physical Organic Chemistry, NAS of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: shmanai@ifoch.bas-net.by

The synthesis of modified proteins and protein conjugates is an important challenge due to high demand for those products from medicine and molecular biology. While recent methods of modification of biomolecules are mostly based on statistical interaction, we are developing methods for controlled introduction of labile functional groups into protein molecules. It is widely known that the synthesis of azide-labeled proteins enables one to obtain much more complex bioconjugates using copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction.

We have modified bovine serum albumin (BSA) with azide function. Firstly, a biocompatible hydrophilic nucleophile-reactive linker **1** bearing azide function was synthesized from commercially available tetra(ethylene glycol). BSA and the linker **1** were reacted in different molar ratios, then the azido-modified products **2** were isolated, introduced into reaction with alkyne-modified carboxyfluorescein (FAM) **3,** and characterized with UV-Vis spectroscopy. The dependence of the number of introduced azide functions on molar excess of the reagent was calculated from protein/dye absorption ratio in the conjugates **4**.



Site-specific modification of protein is required to preserve the biological activity of a protein. For this purpose, we have synthesized the linker **5** containing hydrazide function which can be used for derivatization of glycoproteins, e.g. antibodies, by reaction with aldehyde groups formed from oxidation of carbohydrate moieties of proteins by sodium periodate. Being highly chemo selective, the modification does not affect Fab-fragments and allows to preserve antigen-binding properties. Azido-modified antibodies **6** can be subsequently coupled with alkyne-modified enzymes, DNA, dyes, and pharmaceuticals by cycloaddition reaction to form conjugates widely used in different fields of biotechnology.

The methods reported allow controlled introduction of functions into protein molecules thus enabling one to choose between accurate modification retaining the biological activity of proteins and high loading in immunogen carriers.

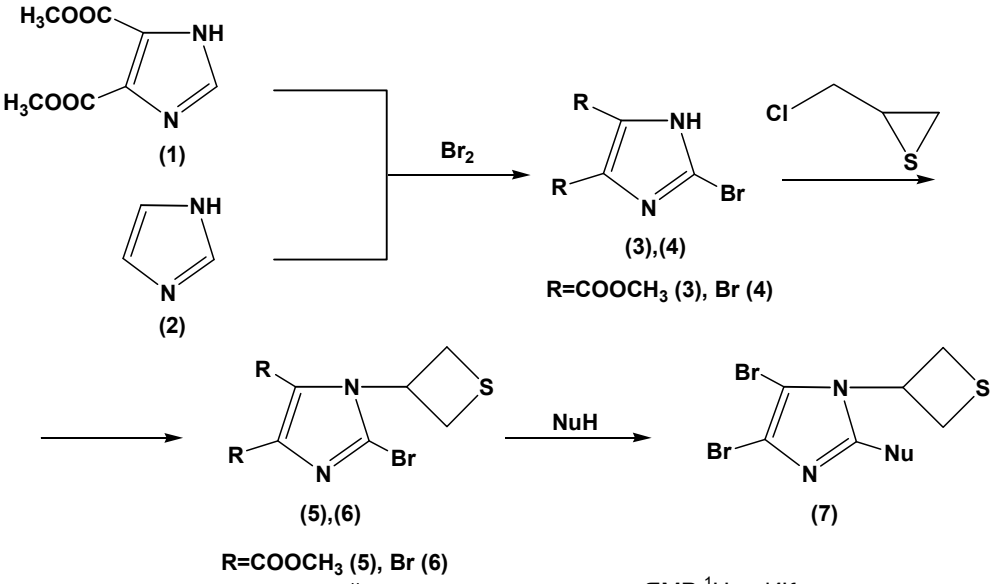
ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ИМИДАЗОЛОВ, СОДЕРЖАЩИХ ТИЕТАНОВЫЙ ЦИКЛ

[1]Халиуллин Ф.А., [2]Вахитова Ю.В., [1]Шарипов И.М., [1]Валиева А.Р., [1]Исхакова Г.Ф.

[1]ГОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет Росздрава, Уфа, Россия.
e-mail: khaliullin_ufa@yahoo.com
[2]УРАН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

Производные имидазола широко используются в медицине. Нами проводятся исследования методов синтеза, физико-химических свойств и биологической активности имидазолов, содержащих тиетановый цикл.

В качестве исходных соединений были использованы диметиловый эфир имидазол-4,5-дикарбоновой кислоты **(1)**, синтезированный по известной методике [1], а также имидазол **(2)**. Последующим бромированием [2] были получены соответствующие бромпроизводные **(3,4)**. При алкилировании последних 2-хлорметилтииираном в присутствии водной щелочи в результате тииран-тиетановой перегруппировки [3] были синтезированы 2-бром-N-(тиетанил-3)имидазолы **(5,6)**. Реакциями соединения **(6)** с различными N-, O-, S-нуклеофилами образуются 2-замещенные 4,5-дибром-1-(тиетанил-3)-имидазолы **(7)**.



Строение синтезированных соединений подтверждено данными ЯМР ^{1}H- и ИК- спектроскопии.

В лаборатории молекулярной фармакологии и иммунологии ИБГ УНЦ РАН создана in vitro тест-система, позволяющая проводить оценку потенциальных цитотоксических свойств соединений на ранних этапах их разработки в качестве лекарств. Для выявления цитотоксической активности клеток использовали витальный краситель Alamar Blue (Invitrogen, США), содержащий нефлуоресцентный краситель резазурин, трансформирующийся в резафурин при изменении метаболической активности клеток. Данный тест в настоящее время является одним из основных нерадиометрических методов оценки жизнеспособности и пролиферативной активности клеток линии HEK293. Исследуемые вещества **(6,7)** растворяли в 0,1% ДМСО и инкубировали с культурами клеток в диапазоне концентраций 0,1мкМ – 5мМ в течение 72 ч. Флюоресценцию измеряли в люминесцентном спектрофотометре LCZ (Perkin Elmer, США) в формате 96-ти луночных планшет. Снижение пролиферативной активности клеток под действием исследуемых веществ расценивали как проявление цитотоксического действия. В качестве препарата сравнения использовали фторурацил, характеризующийся выраженными токсическими свойствами (IC_{50} 6,7 мкМ для использованной тест-системы). Установлено, что ни одно из веществ в исследуемом диапазоне концентраций не оказывало ингибирующего влияния на пролиферацию и не вызывало гибели клеток, что позволяет сделать вывод об отсутствии цитотоксических свойств у данной группы химических соединений.

Литература:

1. *Виноградова Н.Б.* Диметиловый эфир имидазол-4,5-дикарбоновой кислоты / Н.Б. Виноградова, Н.В. Хромов-Борисов // Методы получения химических реактивов и препаратов.- М.: ИРЕА, 1966.- С. 40-44.
2. *Пожарский А.Ф., Анисимова В.А., Цупак Е.Б.* // Практические работы по химии гетероциклов. – Изд-во Ростовского университета, 1998. – 160 с.
3. *Фокин А.В., Коломиец А.Ф.* Химия тииранов. М.: Химия, 1978, С. 38.

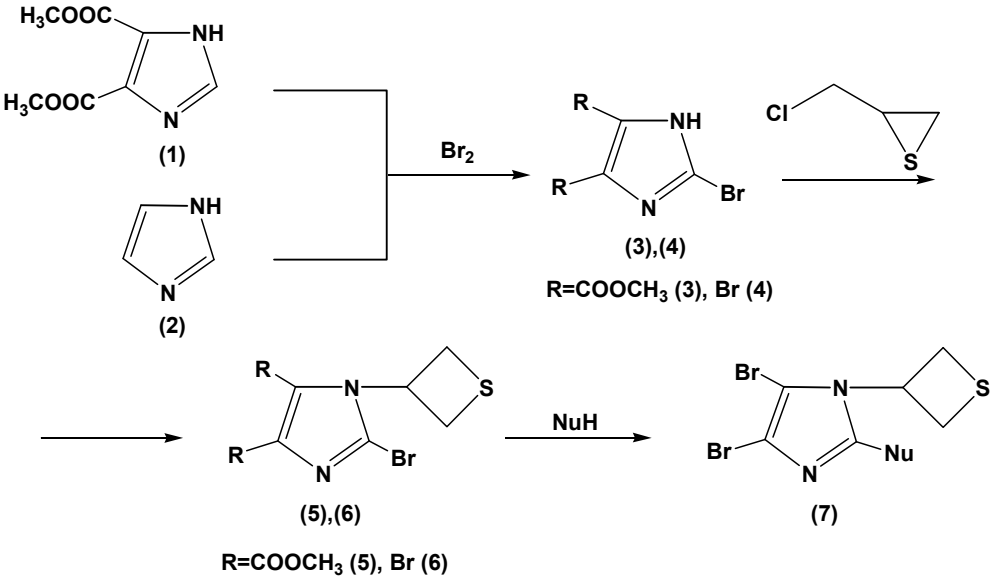
STUDY OF CYTOTOXICITY OF IMIDAZOLES CONTAINING THIETANE RING

[1]Khaliullin F.A., [2]Vakhitova Yu.V., [1]Sharipov I.M., [1]Valiyeva A. R., [1]Iskhakova G.F.

[1]Bashkir State Medical University, Ufa, Russia
e-mail: khaliullin_ufa@yahoo.com
[2]Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa, Russia

Imidazole derivatives are widely used in medicine. We are researching of methods of synthesis, physical-chemical properties and biological activity of imidazoles containing thietane ring.

Dimethyl imidazole-4,5-dicarboxylic acid **(1)**, synthesized by a known procedure [1], and imidazole **(2)** were used as initial compounds. Corresponding bromoderivatives **(3,4)** were obtained by bromination of compounds **(1,2)**. 2-Bromo-N-(thietanyl-3)imidazoles were synthesized by alkylation of bromoderivatives **(3,4)** with 2-methylthiirane in water in the presence of alkali. 2-Substituted 4,5-dibromo-1-(thietanyl-3)-imidazoles **(7)** were synthesized by reaction of substitution of compound **(6)** with various N-, O-, S-nucleophiles.



The structure of the synthesized compounds were confirmed by 1H NMR and IR spectroscopy.

Test-system in vitro was established in the Laboratory of Molecular Pharmacology and Immunology of the Institute of Biochemistry and Genetics. It allow evaluation of potential cytotoxic properties of compounds in the early stages of their development as drugs. Vital dye Alamar Blue (Invitrogen, USA), containing the dye not fluorescent rezazurin, transformed into rezafurin when the metabolic activity of cells, was used to identify the cytotoxic activity of the cells. This test is currently one of the key of not radiometric methods are allowing to assess the viability and proliferative activity of the cells line HEK293. The investigated substances **(6,7)** were dissolved in 0.1% DMSO and were incubated with cell cultures in a concentration range 0.1 mM - 5 mm within 72 hours. Fluorescence was measured in the fluorescent spectrophotometer LCZ (Perkin Elmer, USA) in the format of 96 well plates. Reduced proliferative activity of cells under the influence of test substances was regarded as a manifestation of the cytotoxic effect. Fluorouracil, characterized by expressed toxic properties (IC50 6,7 m for the used test system), was used as a reference drug. It was established that the testing substances in the studied range of concentrations did not exert inhibitory effect on proliferation and not caused cell death. It suggests the absence of cytotoxic properties in this group of chemical compounds.

References:

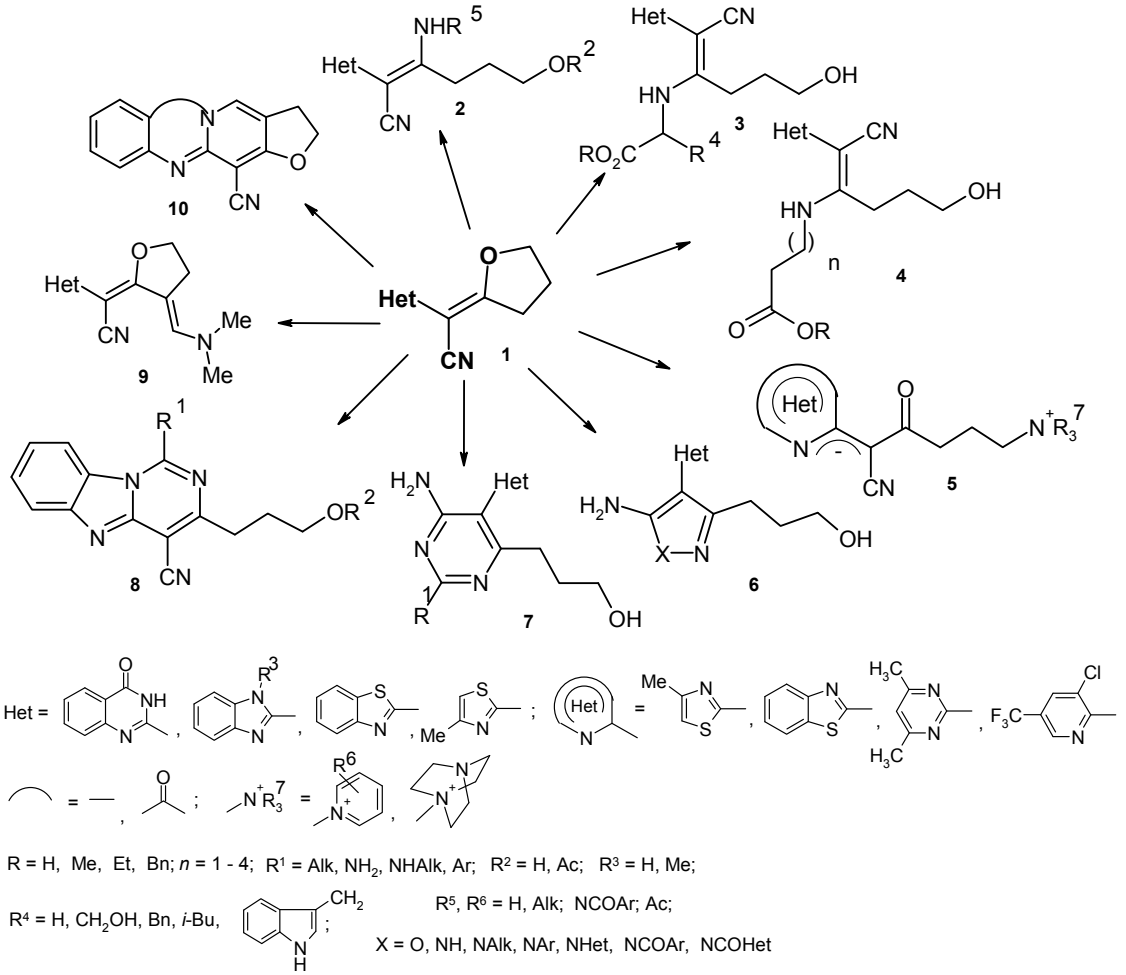
1. *Vinogradova N.B.* Dimethyl imidazole-4,5-dicarboxylic acid / N.B. Vinogradova, N.V. Khromov-Borisov, Methods of obtaining of chemicals and drugs .- Moscow: IREA, 1966 .- P. 40-44.
2. *Pozharskii A.F., Anisimova V.A., Tsupak E.B.* // Practical work on heterocyclic chemistry. - Publishing House of Rostov University, 1998. - 160.
3. *Fokin A.V., Kolomiets A.F.* Chemistry of thiiranes. Moscow: Khimiya, 1978, p. 38.

РЕАКЦИИ 2-ГЕТАРИЛ-2-(ТЕТРАГИДРО-2-ФУРАНИЛИДЕН)АЦЕТОНИТРИЛОВ С НУКЛЕОФИЛЬНЫМИ И ЭЛЕКТРОФИЛЬНЫМИ АГЕНТАМИ

Хиля О.В., Милохов Д.С., Кулай И.В., Воловненко Т.А., Воловенко Ю.М.

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

2-Гетарил-2-(тетрагидро-2-фуранилиден)ацетонитрилы **1** - полифункциональные соединения, что позволяет их модифицировать как нуклеофильными, так и электрофильными агентами. Ранее нами было показано, что фуранилиденовый фрагмент соединений **1** легко раскрывается под действием первичных алифатических аминов с образованием соединений **2** [1], использование третичных аминов позволяет получать биполярные производные **5**. В результате взаимодействия нитрилов **1** с α-, β, γ-, ε-аминокислотами или их эфирами образуются 3-(R-амино)-2-гетарил-6-гидрокси-2-гексаннитрилы **3**, **4**, некоторые из них проявляют антивирусные свойства. Реакции 1,2- и 1,3-бинуклеофилов с нитрилом **1** дают продукты рециклизации **6**, **7**, **8.** Производные **9**, **10** образуются при взаимодействии соединений **1** с диметилацеталем диметилформамида.



Структуры полученных соединений подтверждаются данными спектроскопии ЯМР ^{1}H, ^{13}C, ИК, элементного анализа, масс-спектрометрии, РСА.

Литература:

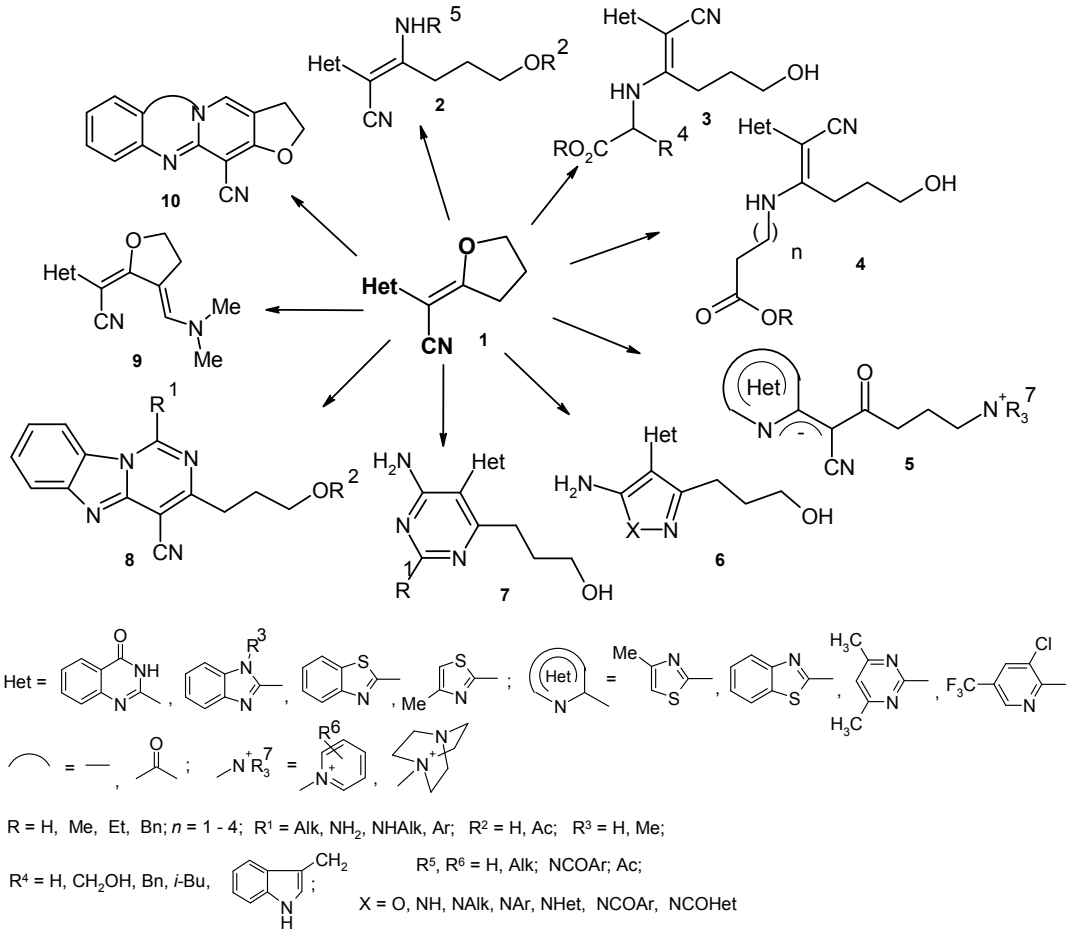
1. *Воловенко Ю.М., Хиля О.В., Воловненко Т.А.* 2-Гетарил-2-(тетрагидро-2-фуранилиден)ацетонитрилы - новые полифункциональные реагенты // в кн. Кислород- и серусодержащие гетероциклы, под. ред. Карцева В.Г., М.: IBS PRESS, 2003, т. 1, с. 217-221.

REACTIONS OF 2-HETARYL-2-(TETRAHYDRO-2-FURANYLIDEN)ACETONITRILES WITH NUCLEOPHILIC AND ELECTROPHILIC AGENTS

Khilya O.V., Milokhov D.S., Kulay I.V., Volovnenko T.A., Volovenko Yu.M.

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

2-Hetaryl-2-(tetrahydro-2-furanyliden)acetonitriles **1** are polyfunctional compounds that can modify them as nucleophilic and electrophilic agents. We have previously shown that fragment of furanyliden of compounds **1** readily opens under the action of primary aliphatic amines with the formation of compounds **2** [1], the use of tertiary amines leads to bipolar derivatives **5**. The interaction of nitriles **1** with α-, β, γ-, ε-amino acids or their esters leads to 3 - (R-amino)-2-hetaryl-6-hydroxy-2-hexanenitriles **3**, **4**, some of them exhibit antiviral properties. Reactions of 1,2 - and 1,3-binucleophiles with nitrile **1** yield products of recyclization - **6**, **7**, **8**. Derivatives **9** and **10** formed in the interaction of compounds **1** with dimethylformamide dimethyl acetal.



The structure of compounds was proved by the data of NMR ^{1}H, ^{13}C, IR spectroscopy, elemental analysis, mass spectrometry, X-ray structural analysis.

References:

1. *Volovenko Yu.M., Khilya O.V., Volovnenko T.A.* 2-Hetaryl-2-(tetrahydro-2-furanylidene)acetonitriles as new polyfunctional reagents // in: Oxygen- and sulfur-containing heterocycles", Moscow: IBS PRESS, Kartsev V.G., Ed., 2003, vol. 1, p. 449-453.

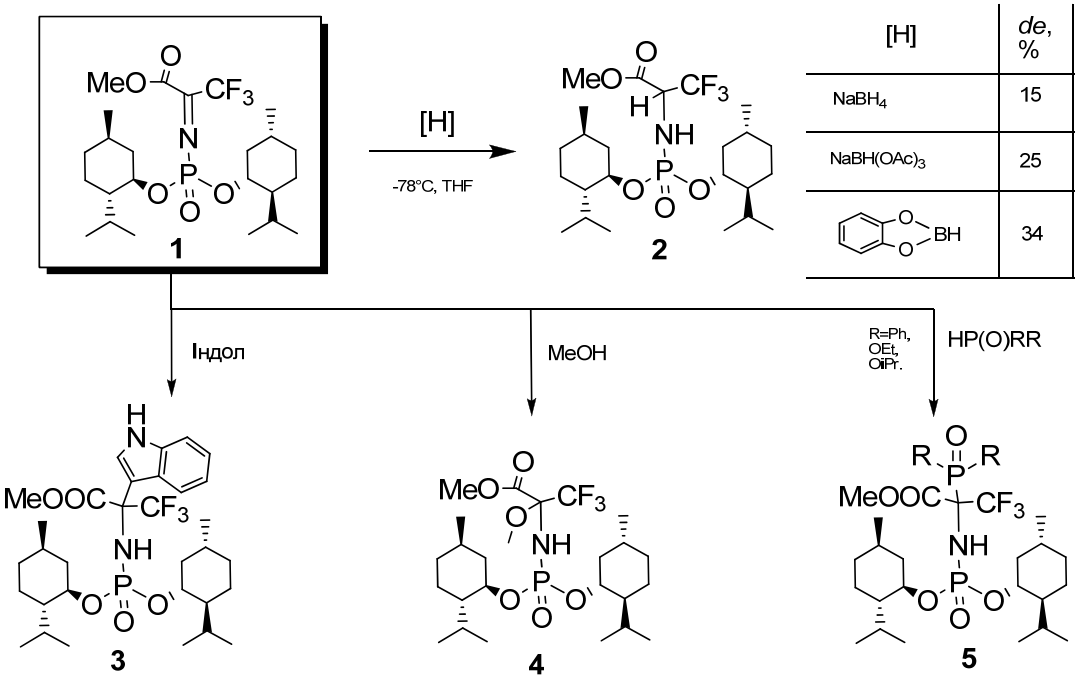
НОВИЙ ПІДХІД ДО АСИМЕТРИЧНОГО СИНТЕЗУ БІОАКТИВНИХ ПОХІДНИХ ТРИФЛУОРОАЛАНІНУ

Хомутник Я.Я., Рассукана Ю.В., Онисько П.П., Синиця А.Д.

Інститут органічної хімії НАН України, Київ, Україна
e-mail: onysko@rambler.ru

Широка розповсюдженість α-амінокислот в біологічних об'єктах зумовлює важливість розробки нових методів синтезу таких сполук, особливо в енантіомерно чистому вигляді. Флуор є унікальним інструментом для модифікації біологічної активності. Так, відомо, що похідні трифлуороаланіну проявляють широкий спектр біологічної дії [1,2]. Це обумовлює постійно зростаючий інтерес до синтезу флуоровмісних хіральних будівельних блоків. Нами розроблено зручний метод синтезу іміну трифлуоропірувату **1,** який містить стереонаправляючу та одночасно активуючу диментоксифосфорильну групу біля атома нітрогену.

Синтетичні можливості іміну **1** продемонстровані на схемі. Зокрема, висока реакційна здатність сполуки робить можливою її легку функціоналізацію навіть при реакції з слабкими C-, O-, S-, та P-центрованими нуклеофілами, що відкриває шлях до різноманітних хіральних похідних трифлуороаланіну, які містять атом гідрогену (**2**), гетероциклічний залишок (**3**), алкокси групу (**4**), або фосфоровмісний залишок (**5**) при α-атомі карбону.



[H]	*de*, %	вихід, %
$NaBH_4$	15	>95
$NaBH(OAc)_3$	25	99
	34	95

Слід зазначити, що незважаючи на помірну діастереоселективність наведених реакцій, вони можуть бути використані для препаративного асиметричного синтезу. Високий діастереомерний надлишок синтезованих кристалічних сполук можна легко досягнути звичайною кристалізацією. Так, однократна кристалізація захищеного трифлуороаланіну **2** приводить до сполуки з *de* >99%.

Література:

1. *D. Alexeev, R.L. Baxter* // Suicide inhibition of alpha-oxamine synthases: structures of the covalent adducts of 8-amino-7-oxononanoate synthase with trifluoroalanine -Org. Biomol. Chem., 2006, 7, p. 1209-1212.
2. *Y. Guo, K. Fujiwara, K.Uneyama* // A novel route to dipeptides via noncondensation of amino acids: 2-aminoperfluoropropene as a synthon for trifluoroalanine dipeptides -Org Lett. 2006, 8, p. 827-829

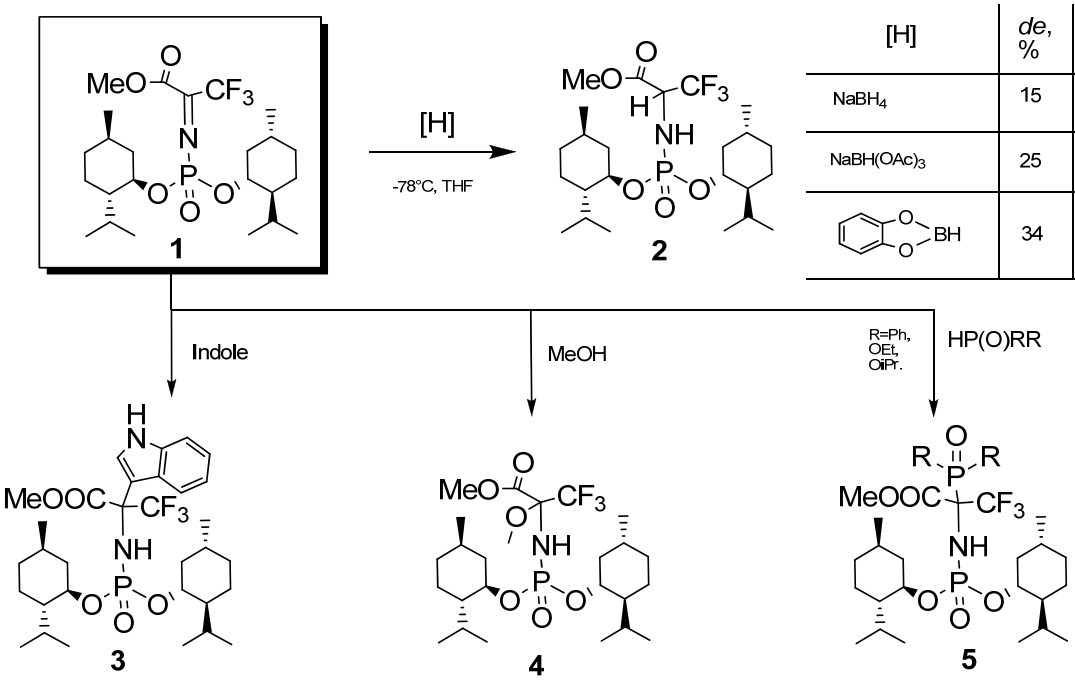
NEW APPROACH FOR ASYMMETRIC SYNTHESIS OF TRIFLUOROALANINE BIOACTIVE DERIVATIVES

Khomutnyk Y.Y., Rassukana Yu. V., Onys'ko P.P., Synytsya A.D.

Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine, 02660 Kyiv, Ukraine. e-mail: onysko@rambler.ru

The occurrence of α-amino acids in biological systems underlies the importance of new methods for their synthesis in enantiomerically pure form. Fluorine is a unique tool for modifying bioactivity. Trifluoroalanine derivatives, in particular, reveal wide spectrum of biological activity [1,2]. Consequently there is a growing interest in the synthesis of chiral fluorine containing building blocks. We have developed convenient method for the preparation of trifluoroiminopyruvate **1** bearing stereodirecting and at the same time activating dimenthoxyphosphoryl group at the nitrogen atom.

Synthetic potential of the imine **1** is demonstrated on the Scheme. In particular, high reactivity of the compound allows its easy functionalization even with weak C-, O-, S-, and P-centered nucleophiles to afford various chiral trifluoralanine derivatives bearing hydrogen (**2**), heterocyclic moiety (**3**), alkoxy group (**4**), or phosphoryl residue at α-atom (**5**).



[H]	*de*, %	yield, %
$NaBH_4$	15	>95
$NaBH(OAc)_3$	25	99
	34	95

It should be noted that in spite of moderate *de* in reactions studied, they can be used for preparative asymmetric synthesis; crystalline compounds **2-5** can be easily enriched by simple crystallization. Thus, after only one crystallization, protected trifluoroalanine **2** was obtained with *de* exceeding 99%.

References:

1. *D. Alexeev, R.L. Baxter* // Suicide inhibition of alpha-oxamine synthases: structures of the covalent adducts of 8-amino-7-oxononanoate synthase with trifluoroalanine -Org. Biomol. Chem., 2006, 7, p. 1209-1212.
2. *Y. Guo, K. Fujiwara, K.Uneyama* // A novel route to dipeptides via noncondensation of amino acids: 2-aminoperfluoropropene as a synthon for trifluoroalanine dipeptides -Org Lett. 2006, 8, p. 827-829

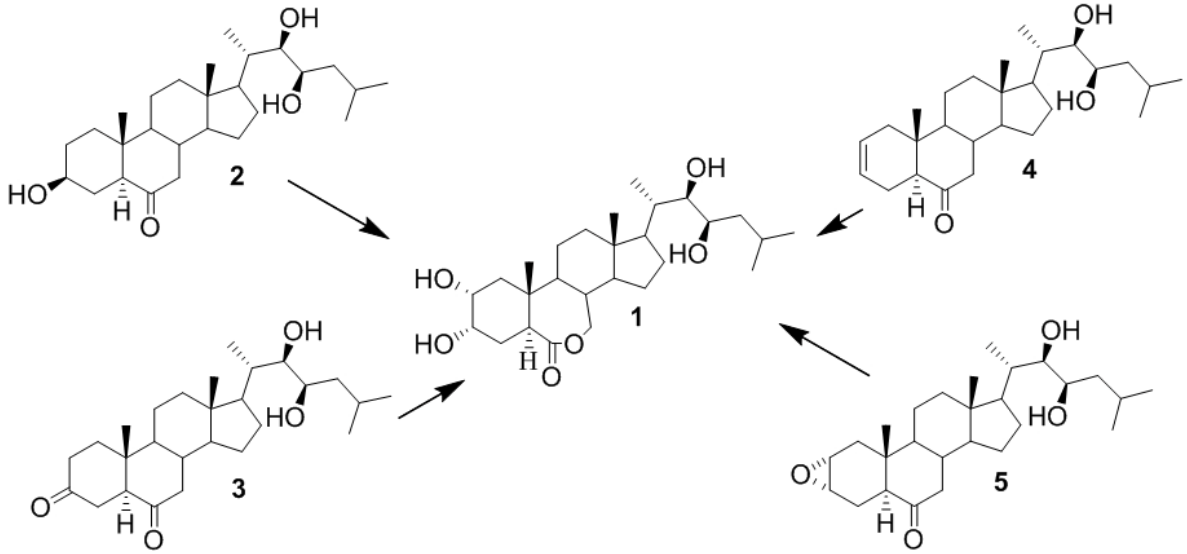
СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ 28-НОРБРАССИНОЛИДА

[1] Хрипач В.А., [1] Жабинский В.Н., [1] Ермолович Ю.В., [1] Гулякевич О.В., [2] Мишарин А.Ю., [2] Мехтиев А.Р., [2]Каралкин П.А.

[1]Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 220141, Минск, Беларусь
e-mail: khripach@iboch.bas-net.by
[2]Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва, Россия

Цитотоксичные оксистерины и их синтетические производные обладают значительным потенциалом для использования в фармакологии и практической медицине в качестве противоопухолевых препаратов. Ранее было показано [1-3], что фитогормоны брассиностероиды, регулирующие рост растений и их устойчивость к стрессу, способны также подавлять рост и вызывать гибель раковых клеток у животных организмов.

В ходе исследований по получению биосинтетических предшественников норбрассинолида **1** нами был осуществлен синтез соединений **2**-**5**, некоторых близких по структуре производных с модифицированным циклом А и/или диольной группировкой боковой цепи и изучена их биологическая активность.



Исследование этих соединений в качестве регуляторов пролиферации в клетках MCF-7 и LnCaP показало, что большинство неполярных (22R,23R)-производных эффективно подавляли пролиферацию, в то время как их (22S,23S)- и (22R,23S)-эпимеры не обладали антипролиферативной активностью. В культуре клеток карциномы простаты человека линии LnCap выявлена зависимость пролиферации от концентрации вещества для исследуемых соединений (IC50=13-25 μM при 72 ч инкубации в среде, содержащей 10% FBS; подавление биосинтеза ДНК). Соединения **3**, **4**, **5** стимулировали апоптоз (23-33 %); блокировали клеточный цикл в S- и G2/M-фазах; вызывали частичное открепление клеток при продолжительной инкубации.

Литература:

1. *J. Malíková, J. Swaczynová, Z. Kolář, M. Strnad*. // Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids – Phytochemistry, 2008, vol. 69, p. 418-426.
2. *A. Y. Misharin, A. R. Mehtiev, G. E. Morozevich, Y. V. Tkachev, V. P. Timofeev*. // Synthesis and cytotoxicity evaluation of 22,23-oxygenated stigmastane derivatives - Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, vol. 16, p. 1460-1473.
3. *A. Y. Misharin, A. R. Mehtiev, V. N. Zhabinskii, V. A. Khripach, V. P. Timofeev, Y. V. Tkachev*. // Toxicity of (22R,23R)-22,23-dihydroxystigmastane derivatives to cultured cancer cells – Steroids, 2010, vol. 75, p. 287-294.

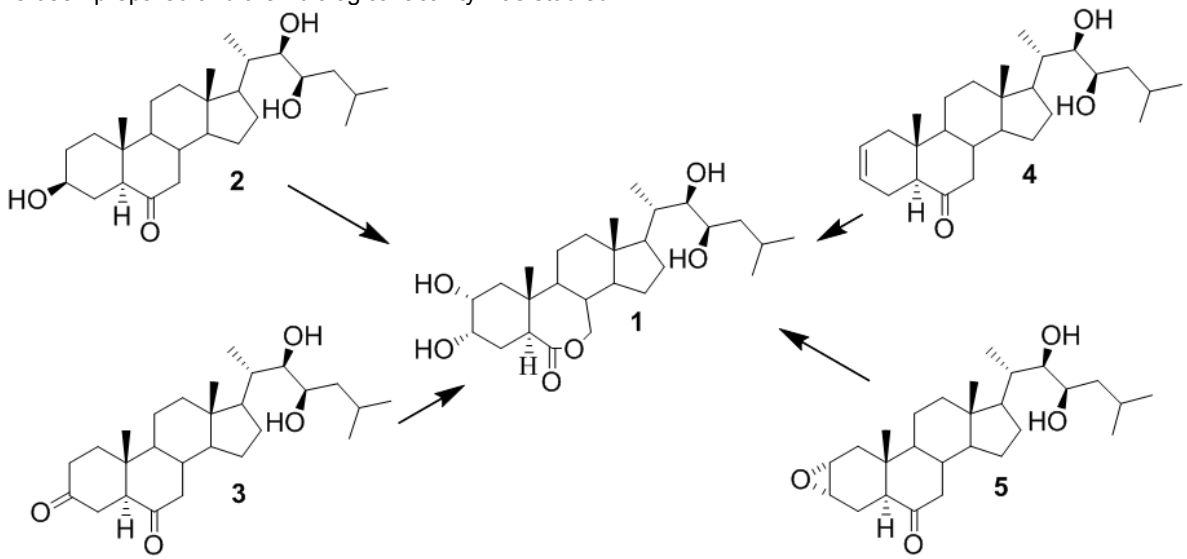
SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF POTENTIAL BIOSYNTHETIC PRECURSORS OF 28-NORBRASSINOLIDE

[1] Khripach V.A., [1] Zhabinskii V.N., [1] Ermolovich Yu.V., [1] Gulyakevich O.V., [2] Misharin A.Yu., [2] Mehtiev A.R., [2] Karalkin P.A.

[1]Institute of Bioorganic Chemistry NAS of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: khripach@iboch.bas-net.by
[2]V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Moscow, Russia

Cytotoxic oxysterols and their synthetic derivatives have a considerable potential for the use in pharmacology and practical medicine as antitumor agents. It has been shown earlier [1-3] that phytohormones brassinosteroids which are involved in regulating plant growth and stress responses are able also to suppress growth and to kill tumor cells in animal models.

In the course of our investigations on preparation of 28-norbrassinolide **1** biosynthetic precursors, 22R,23R-derivatives **2**-**5** and a number of related compounds with a modified A-cycle and/or diol group in the side chain have been prepared and their biological activity was studied.



Studies of these compounds as proliferation regulators in MCF-7 and LnCaP cells showed that most nonpolar (22R,23R)-derivatives effectively suppressed proliferation whereas their (22S,23S)- and (22R,23S)-epimers exhibited no antiproliferative activity. Dependence of proliferation on concentration of studied compounds was found in human prostate carcinoma LnCaP cells (IC_{50}=13-25 μM at 72 h of incubation in a medium containing 10% FBS; suppression of DNA biosynthesis). Compounds **3**, **4**, **5** induced apoptosis (23-33 %); arrested cell cycle in S- and G2/M-phases; and caused partial cells detachment during prolonged incubations.

References

1. *J. Malíková, J. Swaczynová, Z. Kolář, M. Strnad*. // Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids – Phytochemistry, 2008, vol. 69, p. 418-426.
2. *A. Y. Misharin, A. R. Mehtiev, G. E. Morozevich, Y. V. Tkachev, V. P. Timofeev*. // Synthesis and cytotoxicity evaluation of 22,23-oxygenated stigmastane derivatives - Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, vol. 16, p. 1460-1473.
3. *A. Y. Misharin, A. R. Mehtiev, V. N. Zhabinskii, V. A. Khripach, V. P. Timofeev, Y. V. Tkachev*. // Toxicity of (22R,23R)-22,23-dihydroxystigmastane derivatives to cultured cancer cells – Steroids, 2010, vol. 75, p. 287-294.

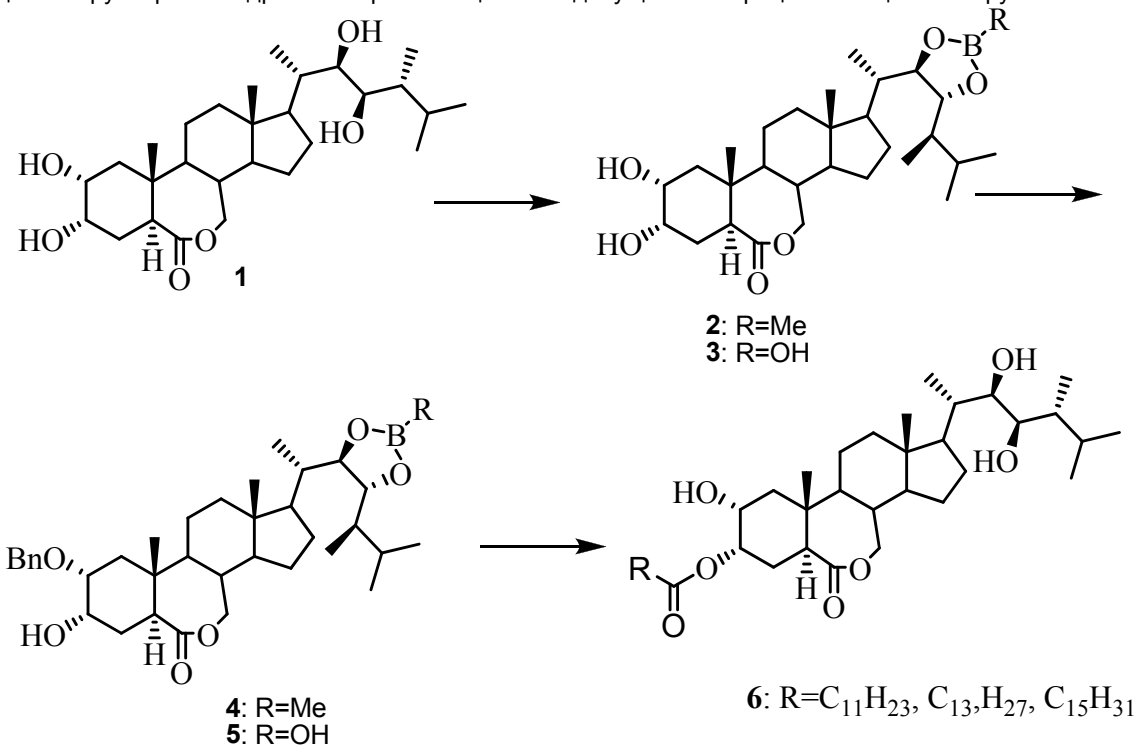
СИНТЕЗ ЭФИРОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА

Хрипач В.А., Жабинский В.Н., Цавловский Д.В., Хрипач Н.Б.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: khripach@iboch.bas-net.by

Со времени обнаружения в 1979 г первого стероидного гормона растений (брассинолида) накоплен большой объем данных по биосинтезу данного класса соединений. Относительно мало известно о метаболических превращениях брассинолида и родственных соединений – брассиностероидов. Причиной этого, отчасти, является низкая доступность метаболитов брассиностероидов (известных или предполагаемых), которые могли бы служить в качестве эталонных образцов в биохимических исследованиях. Настоящая работа посвящена синтезу производных 24-эпибрассинолида содержащих жирнокислотный остаток при С-3.

Синтетический путь основан на стратегии селективного использования защитных групп. Ключевой стадией является первоначальная защита диольной группировки боковой цепи в соответствии с методологией разработанной нами ранее [1]. Получение соединений **6** потребовало решения ряда новых проблем, включая удаление боронатного остатка из 22,23-циклического эфира и надлежащий выбор защитной группировки гидроксила при С-2 с целью недопущения миграции С-3 ацильной группы.



В докладе будут обсуждены характерные физико-химические свойства синтезированных соединений, проявляющиеся, в частности, в их спектральных характеристиках, а также перспективы применения новых полученных веществ в качестве биорегуляторов для сельского хозяйства и медицины.

Литература

1. *V. A. Khripach, V. N. Zhabinskii, Y. Y. Zhiburtovich, G. V. Ivanova, O. V. Konstantinova, D. V. Tsavlovskii, S. Lorenz, B. Schneider.* // Preparation and synthetic application of partially protected brassinosteroids – Steroids, 2010, vol. 75, p. 27-33.

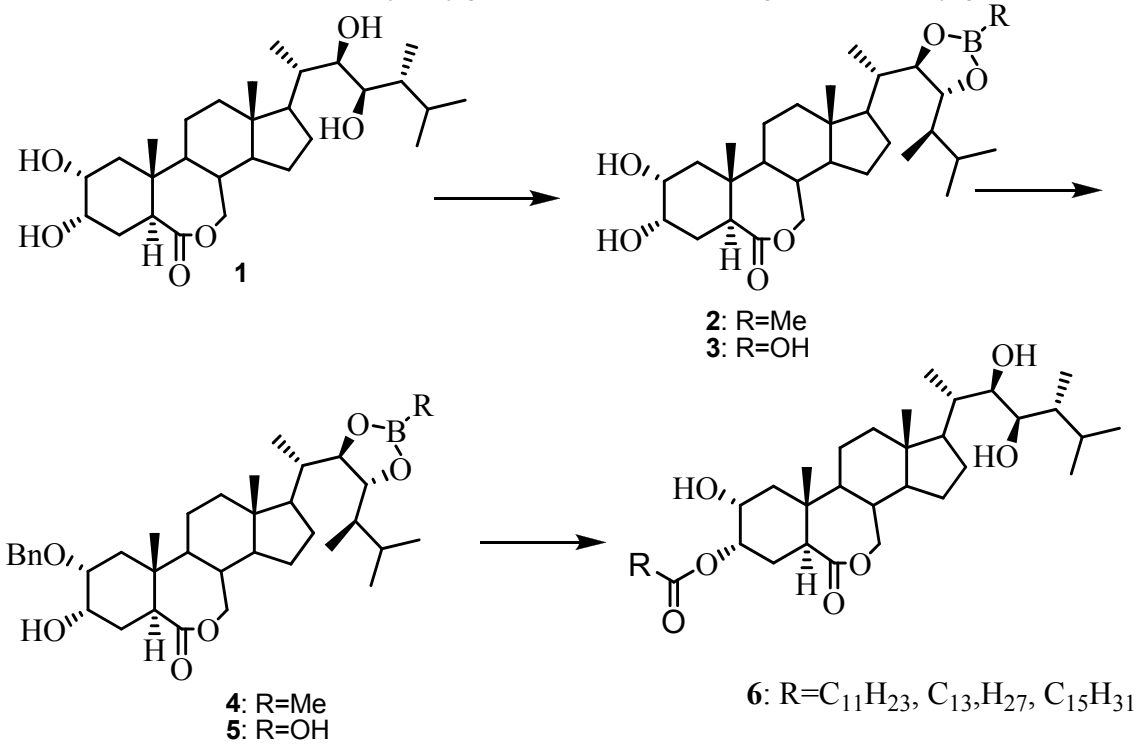
SYNTHESIS OF FATTY ACYL DERIVATIVES OF 24-EPIBRASSINOLIDE

Khripach V.A., Zhabinskii V.N., Tsavlovskii D.V., Khripach N.B.

Institute of Bioorganic Chemistry, Minsk, Belarus
e-mail: khripach@iboch.bas-net.by

Since the isolation of the first steroidal plant hormone (brassinolide) in 1979, a lot of knowledge has been accumulated on the biosynthesis of this class of phytohormones. Relatively little, however, is known about metabolic fate of brassinolide and other related compounds called brassinosteroids. At least in part it is because of poor availability of brassinosteroid metabolites (real or supposed) which could be used as reference compounds in biochemical studies. The present work deals with the preparation of 24-epibrassinolide derivatives having a fatty acid ester moiety at C-3.

The whole synthetic route was based on the selective protection/deprotection methodology that included protection of 22,23-diol function as initial step in accordance with the procedure developed earlier [1]. The preparation of compounds **6** required the solution of two main problems: removal of boronate moiety in 22,23-cyclic esters and proper choice of C-2 hydroxy group protection to avoid migration of C-3 acyl group.



Specific physico-chemical properties of the synthesized compounds reflected in their spectral characteristics and their prospects as new bioregulators for agriculture and medicine will be discussed.

References:

1. *V. A. Khripach, V. N. Zhabinskii, Y. Y. Zhiburtovich, G. V. Ivanova, O. V. Konstantinova, D. V. Tsavlovskii, S. Lorenz, B. Schneider.* // Preparation and synthetic application of partially protected brassinosteroids – Steroids, 2010, vol. 75, p. 27-33.

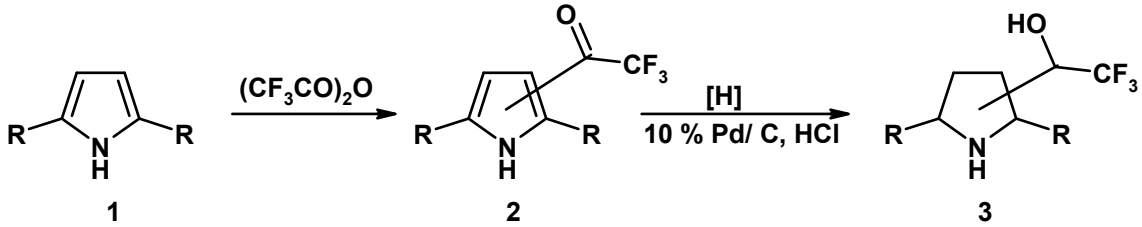
НОВИЙ СПОСІБ ОТРИМАННЯ ТРИФЛУОРОГІДРОКСИПІРОЛІДИНІВ

Чайковська О.О., Юрченко О.О., Лахтадир О.І., Юрченко С.О., Смалій Р.В., Штиль Н.А., Костюк О.М.

Інститут органічної хімії НАН України, Київ, Україна
e-mail: Chaikoff2005@ukr.net

Одним із перспективних напрямків синтезу речовин із цілеспрямовано заданими фармакологічними властивостями є розробка доступних методів отримання трифлуорогідроксипіролідинів. Ці сполуки зарекомендували себе як ефективні та селективні нестероїдні андрогенні рецепторні модулятори [1, 2]. Але, не зважаючи на фармакологічну та каталітичну привабливість [3], методи їх синтезу розроблені недостатньо.

Нами запропоновано простий та доступний метод синтезу цих корисних сполук **(3)** каталітичним гідруванням на 10 % Pd/C в кислому середовищі відповідних 2- та 3-трифлуороацильованих піролів **(2)**, отриманих ацилюванням трифлуороцтовим ангідридом вихідних піролів **(1)**.



R= H, Alk

Література:

1. Patent WO 2009/82437 A2, 2009, LIGAND PHARMACEUTICALS INCORPORATED.
2. *E. Martinborough, Y. Shen, A. Oeveren, J.O. Long, T.L.S. Lan, K.B. Marschke, W. Y. Chang* // Substituted 6-(1-pyrrolidine)quinolin-2(1H)-ones as Novel Selective Androgen receptor modulators, J. Med. Chem., 2007, V. 50, № 21, p. 5049-5052.
3. *K. Funabiki, A. Shibata, H. Iwata, K. Hatano, Y. Kubota, K. Komura, M. Ebihara, M. Matsui* // Asymmetric Synthesis of (αR)-Polyfluoroalkylated Prolinols Based on the Perfluoroalkyl-Induced Highly Stereoselective Reduction of Perfluoroalkyl N-Boc-pyrrolidyl Ketones. J. Org. Chem., 2008, V.73, p. 4694-4697.

THE NEW METHOD OF SYNTHESIS OF TRIFLUOROHYDROXYPYRROLIDINES

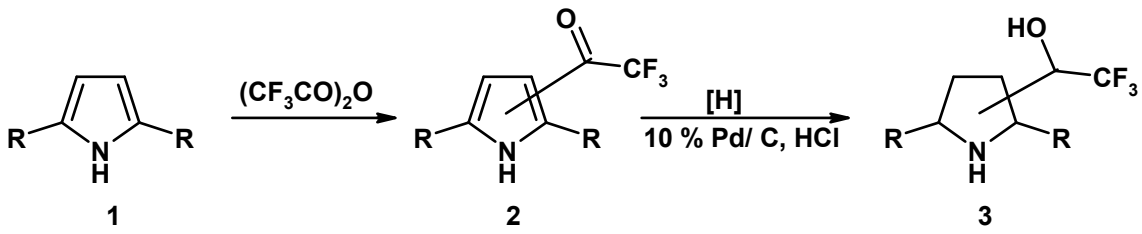
Chaikovska O.O., Yurchenko O.O., Lahtadyr O.I., Yurchenko S.O., Smaliy R.V., Shtil N.A., Kostyuk O.M.

Institute of Organic Chemistry of NAS Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: Chaikoff2005@ukr.net

One of the promising trend in the synthesis of predetermined pharmacologically active compounds is development of convenient methods for preparation of trifluorohydroxypyrrolidines.

These compounds are known as effective and selective human androgen receptors [1, 2]. Despite their pharmacological and catalytical attractiveness [3] the methods for their synthesis are developed insufficiently.

We have proposed a simple and convenient method for synthesis of these useful compounds **(3)** by catalytic hydrogenation of the corresponding 2- and 3- trifluoroacylated pyrroles **(2)** prepared by acylation with trifluoroacetic anhydride of starting pyrroles **(1)** on 10 % Pd/C in acidic medium.



R= H, Alk

References:

1. Patent WO 2009/82437 A2, 2009, LIGAND PHARMACEUTICALS INCORPORATED.
2. *E. Martinborough, Y. Shen, A. Oeveren, J.O. Long, T.L.S. Lan, K.B. Marschke, W. Y. Chang* // Substituted 6-(1-pyrrolidine)quinolin-2(1H)-ones as Novel Selective Androgen receptor modulators, J. Med. Chem., 2007, V. 50, № 21, p. 5049-5052.
3. *K. Funabiki, A. Shibata, H. Iwata, K. Hatano, Y. Kubota, K. Komura, M. Ebihara, M. Matsui* // Asymmetric Synthesis of (αR)-Polyfluoroalkylated Prolinols Based on the Perfluoroalkyl-Induced Highly Stereoselective Reduction of Perfluoroalkyl N-Boc-pyrrolidyl Ketones. J. Org. Chem., 2008, V.73, p. 4694-4697.

ПОХІДНІ АЗОПІРИМІДИНІВ ЯК ІНГІБІТОРИ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2

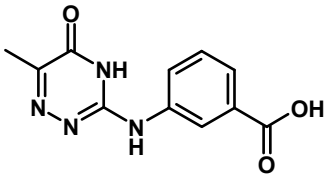
Чеканов М.О., Синюгін А.Р., Тарнавський С.С., Бджола В.Г., Ярмолюк С.М.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна
e-mail: chekanov_maxx@ukr.net

Протеїнкіназа СК2 (Casein Kinase 2) – багатосубстратна Ser/Thr кіназа, що присутня в усіх еукаріотичних клітинах [1]. Вона є проміжною ланкою багатьох сигнальних шляхів клітини і бере участь у різноманітних патологічних процесах. У літературі показано, що інгібітори СК2 можуть бути використані як протизапальні та протипухлинні препарати [2, 3]. Таким чином, пошук нових інгібіторів протеїнкінази СК2 є актуальним.

Робота присвячена пошуку інгібіторів СК2 серед похідних азопіримідинів за допомогою методів комп'ютерного моделювання та біохімічного тестування.

Було проведено рецепторно-орієнтований віртуальний скринінг бібліотеки низькомолекулярних органічних сполук, яка налічувала 156 000 хімічних сполук. На основі показників енергії утворення комплексів низькомолекулярних сполук з ензимом, що були розраховані пакетом програм DOCK 4.0, для тестування *in vitro* було відібрано 172 сполуки різних класів. Знайдено, що сполука 3-[(6-метил-5-оксо-4,5-дигідро-1,2,4-триазин-3-іл)аміно]бензойна кислота (1) пригнічувала активність протеїнкінази СК2 зі значенням IC_{50}=2,5 μM.



1

IC_{50} = 2,5 uM

Біохімічні тестування активності хімічних сполук проводили методом непрямої детекції протеїнкіназної активності (т.зв. «ATP consumption»), який базується на визначенні залишкової концентрації АТФ у реакційній суміші після проведення кіназної реакції. Залишкові концентрації АТФ визначали за допомогою люциферазної суміші (Easy Light kit, PerkinElmer) через рівні інтенсивності люмінесценції, яку вимірювали на люмінометрі (PerkinElmer VICTOR 1420-50 Multilabel Counter).

Сполука (1) має фармакофорний фрагмент – залишок амінобензойної кислоти, як і більшість інших інгібіторів СК2, синтезованих нами раніше [4, 5]. Досліджено взаємодію інгібітора (1) з амінокислотними залишками протеїнкінази СК2 методами комп'ютерного моделювання та встановлено ключові зв'язки.

Здобуті результати можуть бути використані для подальшої оптимізації цього класу сполук з метою отримання більш активних інгібіторів протеїнкінази СК2.

Література:

1. *Pinna L.* Protein kinase CK2 // Int. J. Biochem. Cell. Biol. - 1997. - No. 29. -P. 551-554.
2. *Trembley J.H., Chen Z., Unger G., Slaton J., Kren B.T., Van Waes C., Ahmed K.* Emergence of protein kinase CK2 as a key target in cancer therapy // Biofactors. - 2010. - Vol. 36, No. 3. - P. 187-95.
3. *Pierre F., Chua P.C., O'Brien S.E., Siddiqui-Jain A., Bourbon P., Haddach M., Michaux J., Nagasawa J., Schwaebe M.K., Stefan E., et al.* // J. Med. Chem. - 2011. - Vol. 54, No. 2. - P. 635-654.
4. *Чеканов М.О., Синюгін А.Р., Лукашов С.С., Ярмолюк С.М.* Синтез похідних 2-фенілізотіазолідин-3-он-1,1-діоксиду як інгібіторів протеїнкінази СК2 людини // Ukr. Bioorg. Acta. - 2009. - Т. 7, № 1. - P. 62-64.
5. *Котей І.М., Баланда А.О., Бджола В.Г., Лукашов С.С., Кухаренко О.П., Харченко В.М., Ярмолюк С.М.* Синтез і біологічне визначення тієнопіримідинонів як інгібіторів протеїнкінази СК2 // Ukr.Bioorg.Acta. - 2008. - Т.6, № 2. - P. 3-9.

AZOPYRIMIDINES DERIVATIVES AS INHIBITORS OF PROTEIN KINASE CK2

Chekanov M.O., Synyugin A.R., Tarnavsky S.S., Bdzhola V.G., Yarmoluk S.M.

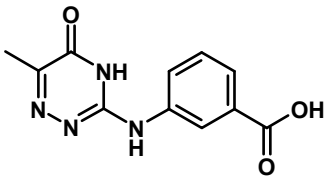
Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: chekanov_maxx@ukr.net

Protein kinase CK2 (Casein Kinase 2) is the multiple substrate Ser/Thr kinase, which exists in all eukaryotic cells [1]. It is an intermediate link of many signal pathways of a cell and takes place in various pathological processes. Inhibitors of CK2 can be used as antiinflammatory and anticancer drugs, as it was shown in literature [2, 3]. Therefore, the search of protein kinase CK2 new inhibitors is timely.

This work is dedicated to the search of CK2 inhibitors among azopyrimidines derivatives by methods of computer modeling and biochemical assays.

Receptor-based virtual screening of small molecule library of organic compounds (consisted of 156 000 chemical compounds) was executed.

Formation energy values of small molecules complexes with enzymes were calculated by the DOCK 4.0 program pack. A resulting 172 compounds from different classes were selected for *in vitro* assays. It was found that compound 3-[(6-methyl-5-oxo-4,5-dihydro-1,2,4-triazin-3-yl)amino]benzoic acid (1) suppressed activity of protein kinase CK2 with value IC_{50}=2,5 μM.



1

IC_{50} = 2,5 uM

Biochemical assays of chemical compounds activity were executed by the method of indirect detection of protein kinase activity («ATP consumption»), which is based on determination of ATP residual concentration in reaction mixture after execution of kinase reaction. ATP residual concentrations were determined with the use of luciferase mixture (Easy Light kit, PerkinElmer) by equal intensity of luminescence, which was measured on luminometer (PerkinElmer VICTOR 1420-50 Multilabel Counter).

Compound (1) has pharmacophore fragment – aminobenzoic acid residue, as well as most of the other CK2 inhibitors which were synthesised previously by our department [4, 5]. Inhibitor (1) interaction with amino acid residues of the protein kinase CK2 was researched by computer modeling methods and crucial relationships were determined.

Collected results can be used for future optimization of these compounds' class with the target of producing more active inhibitors of protein kinase CK2.

References:

1. *Pinna L.* Protein kinase CK2 // Int. J. Biochem. Cell. Biol. - 1997. - No. 29. -P. 551-554.
2. *Trembley J.H., Chen Z., Unger G., Slaton J., Kren B.T., Van Waes C., Ahmed K.* Emergence of protein kinase CK2 as a key target in cancer therapy // Biofactors. - 2010. - Vol. 36, No. 3. - P. 187-95.
3. *Pierre F., Chua P.C., O'Brien S.E., Siddiqui-Jain A., Bourbon P., Haddach M., Michaux J., Nagasawa J., Schwaebe M.K., Stefan E., et al.* // J. Med. Chem. - 2011. - Vol. 54, No. 2. - P. 635-654.
4. *Chekanov M.O., Synyugin A.R., Lukashov S.S., Yarmoluk S.M.* The synthesis of 2-phenylisothiazolidine-3-one dioxide derivatives as inhibitors of protein kinase CK2 // Ukr. Bioorg. Acta. - 2009. - T. 7, № 1. - P. 62-64.
5. *Kotey I.M., Balanda A.O., Bdzhola V.G., Lukashov S.S., Kukharenko O.P., Kharchenko V.M., Yarmoluk S.M.* Synthesis and biologic evaluation of thienopyrimidinones inhibition activity against protein kinase CK2// Ukr.Bioorg.Acta.-2008.-T.6,№ 2.-P.3-9.

СИНТЕЗ И АНТИДЕПРЕССИВНАЯ АКТИВНОСТЬ 8-АМИНОЗАМЕЩЕННЫХ 1-*Н*-БУТИЛ-3-МЕТИЛКСАНТИНОВ, СОДЕРЖАЩИХ ТИЕТАНОВЫЙ ЦИКЛ

Шабалина Ю.В., Никитина И.Л., Халиуллин Ф.А., Шарафутдинов Р.М., Мифтахова А.Ф.

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия
e-mail: khaliullin_ufa@yahoo.com

Кофеин (1,3,7-триметилксантин) оказывает стимулирующее влияние на функции головного мозга, активирует психическую и физическую деятельность организма и применяется в медицине при различных заболеваниях, сопровождающихся угнетением функции центральной нервной системы [1].

С целью поиска среди производных ксантина соединений, влияющих на центральную нервную систему, нами синтезированы 8-аминозамещенные 1-*н*-бутил-3-метилксантины, содержащие тиетановый цикл, и исследована их антидепрессивная активность.

В качестве исходных соединений использовали 7-(тиетанил-3)-, 7-(1-оксотиетанил-3)- и 7-(1,1-диоксотиетанил-3)-8-бром-1-*н*-бутил-3-метилксантины (**1**) [2].

8-Аминозамещенные 7-(тиетанил-3)-, 7-(1-оксотиетанил-3)- и 7-(1,1-диоксотиетанил-3)-1-*н*-бутил-3-метилксантины (**2**) синтезированы взаимодействием исходных 8-бромксантинов (**1**) с различными аминами. Реакции проводили при кипячении в этаноле в течение 5 часов или в диметилформамиде в течение 1 часа. Использование избытка аминов и проведение реакций в высококипящем растворителе диметилформамиде не приводят к раскрытию тиетанового цикла, что подтверждает его высокую устойчивость к действию аминов.

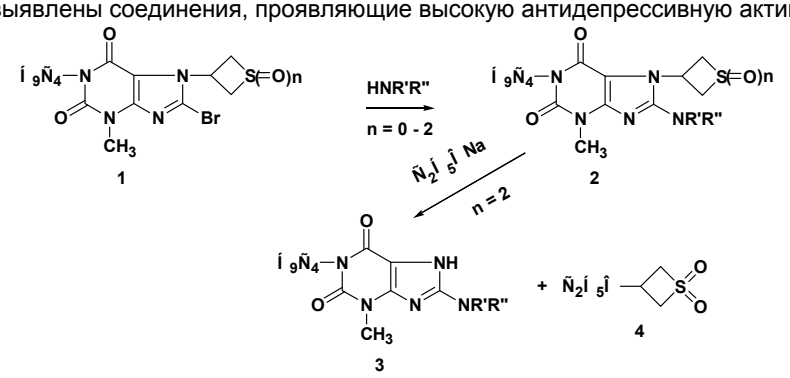
При взаимодействии 1-алкил-8-бром-3-метил-7-(1,1-диоксотиетанил-3)ксантинов с алкоголятами натрия установлено элиминирование тиетандиоксидного цикла с образованием 1-алкил-8-бром-3-метилксантинов [3]. При проведении реакций 8-аминозамещенных 1-*н*-бутил-3-метил-7-(1,1-диоксотиетанил-3)ксантинов с этилатом натрия также происходит элиминирование тиетандиоксидного цикла с образованием 8-аминозамещенных 1-*н*-бутил-3-метилксантинов (**3**) и 1,1-диоксо-3-этокситиетана (**4**).

Структура синтезированных соединений подтверждена данными ИК и ЯМР ^{1}Н-спектроскопии.

В ИК спектрах 8-аминозамещенных 1-*н*-бутил-3-метилксантинов, содержащих тиетаноксидный и тиетандиоксидный цикл, полосы валентных колебаний S=O связи при 1055-1065 см$^{-1}$ и валентных симметричных и асимметричных колебаний SO_2 группы при 1130-1140 и 1310-1320 см$^{-1}$ свидетельствуют о сохранении тиетаноксидного и тиетандиоксидного цикла. В ИК спектрах 8-аминозамещенных 1-*н*-бутил-3-метилксантинов наблюдается интенсивная полоса валентных колебаний N-H связи в области 3050-3300 см$^{-1}$; характерные полосы поглощения симметричных и асимметричных валентных колебаний связей SO_2 группы отсутствуют, что подтверждает предполагаемые структуры 7-NH производных.

Спектры ЯМР ^{1}Н 8-аминозамещенных тиетанилксантинов (**2**) содержат характерные сигналы протонов 1-*н*-бутильного заместителя, метильной группы ксантина, тиетанового цикла и сигналы протонов остатков аминов, что подтверждает нуклеофильное замещение, а также сохранение тиетанового цикла. Элиминирование тиетандиоксидного цикла подтверждается ЯМР ^{1}Н-спектрами соединений **3**, где отсутствуют характерные сигналы протонов диоксотиетанового цикла, наблюдается слабопольный синглет 7-NH группы ксантина при 11,43-11,70 м.д.

При проведении биологических испытаний среди синтезированных 8-аминозамещенных 1-*н*-бутил-3-метилксантинов выявлены соединения, проявляющие высокую антидепрессивную активность.



Литература:

1. *М.Д. Машковский.* // Лекарственные средства.- М.: Новая волна: Издатель Умеренков, 2010.- 1216 с.
2. *Ф.А. Халиуллин, Ю.В. Шабалина, Р.М. Шарафутдинов.* // Тиетанильная защита в синтезе 1-алкил-8-бром-3-метил-3,7-дигидро-1*Н*-пурин-2,6-дионов.- ЖОрХ, 2010, т. 46, № 5, с. 698-701.
3. *Ф.А. Халиуллин, Е.Э. Клен.* // Тиетановый цикл – новая защитная группа.- ЖОрХ, 2009, т. 45, № 1, с. 138-141.

SYNTHESIS AND ANTIDEPRESSANT ACTIVITY OF 8-AMINO-SUBSTITUTED 1-*N*-BUTYL-3-METHYLXANTHINES CONTAINING THIETANE RING

Shabalina Yu.V., Nikitina I.L., Khaliullin F.A., Sharafutdinov R.M., Miftakhova A.F.

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia
e-mail: khaliullin_ufa@yahoo.com

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) has a stimulating effect on brain function, activating a physical and mental activity of the body and is used in medicine for various diseases involving suppression of the central nervous system [1].

In order to search among xanthine derivatives of compounds that affect the central nervous system, we synthesized 8-amino-substituted 1-*n*-butyl-3-methylxanthines containing thietane ring, and investigate their antidepressant activity.

The starting compounds used 7-(thietanyl-3)-, 7-(1-oxothietanyl-3)- and 7-(1,1-dioxothietanyl-3)-8-bromo-1-*n*-butyl-3-methylxanthines (**1**) [2].

8-Amino-substituted 7-(thietanyl-3)-, 7-(1-oxothietanyl-3)- and 7-(1,1-dioxothietanyl-3)-1-*n*-butyl-3-methylxanthines (**2**) were synthesized by the interaction of initial 8-bromoxanthines (**1**) with various amines. Reactions were carried out in boiling ethanol for 5 hours or in dimethylformamide for 1 hour. Use of an excess of amines and the reactions in a high boiling solvent dimethylformamide do not lead to the disclosure thietane ring, which confirms its high resistance to amines.

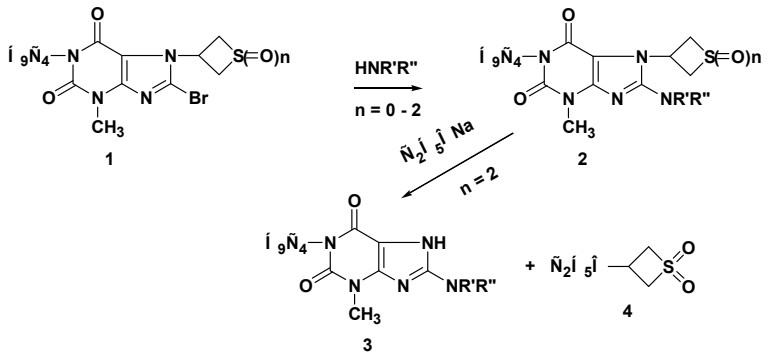
In the interaction of 1-alkyl-8-bromo-3-methyl-7-(1,1-dioxothietanyl-3)xanthines with sodium alkoxides established elimination thietandioxide ring with the formation of 1-alkyl-8-bromo-3-methylxanthines [3]. The reaction 8-amino-substituted 1-*n*-butyl-3-methyl-7-(1,1-dioxothietanyl-3)xanthines with sodium ethoxide elimination also occurs thietandioxide ring with the formation of 8-amino-substituted 1-*n*-butyl-3-methylxanthines (**3**) and 1,1-dioxo-3-ethoxythietane (**4**).

The structure of the synthesized compounds was confirmed by IR and ^{1}H NMR spectroscopy.

The IR spectra of 8-amino-substituted 1-*n*-butyl-3-methylxanthines containing thietanoxide and thietandioxide ring the bands of stretching vibrations of S=O connection at 1055-1065 cm^{-1} and the symmetric and asymmetric stretching vibrations of the SO_2 group in 1130-1140 and 1310-1320 cm^{-1} indicative of the persistence thietanoxide and thietandioxide ring. The IR spectra of 8-amino-substituted 1-*n*-butyl-3-methylxanthines observed an intense band of stretching vibrations of N-H bonds in the 3050-3300 cm^{-1}, characteristic absorption bands of symmetric and asymmetric stretching vibrations of the SO_2 groups are absent, which confirms the expected structure 7-NH derivatives.

^{1}H NMR spectra of 8-amino-substituted thietanylxanthines (**2**) contain characteristic signals of 1-*n*-butyl substituent, methyl group xanthine, thietane ring and the signals of residues of amines, which confirms the nucleophilic substitution, as well as conservation thietane ring. Eliminations thietandioxide ring is confirmed by ^{1}H NMR spectra of compounds **3**, where there are no characteristic signals of protons thietane ring, there singlet 7-NH group of xanthine with 11,43-11,70 ppm.

In carrying out biological tests among the synthesized 8-amino-substituted 1-*n*-butyl-3-methylxanthines identified compounds that show high antidepressant activity.



References:

1. *M.D. Mashkovsky.* // Drugs.- M.: The New Wave: Publisher Umerenkov, 2010.- 1216 p.
2. *F.A. Khaliullin, Yu.V. Shabalina, and R.M. Sharafutdinov.* // Thietanyl protection in the synthesis of 1-alkyl-8-bromo-3-methyl-3,7-dihydro-1*H*-purine-2,6-diones.- J. Org. Chem., 2010, v. 46, № 5, p. 698-701.
3. *F.A. Khaliullin and E.E. Klen.* // Thietane ring as a novel protecting group.- J. Org. Chem., 2009, v. 45, № 1, p. 138-141.

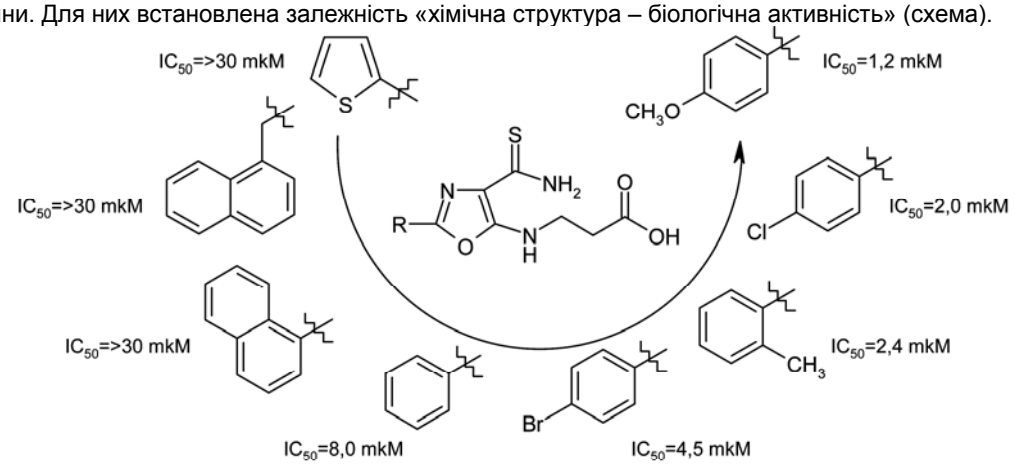
N-(2-АРИЛ-4-ТІОКАРБАМОЇЛ-1,3-ОКСАЗОЛ-5-ІЛ)-β-АЛАНІНИ — СПЕЦИФІЧНІ ІНГІБІТОРИ ПРОТЕЇНКІНАЗИ СК2

Шабликін О.В., Козаченко О.П., [1]Остринська О.В., [1]Кухаренко О.П., Броварець В.С.

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАНУ, Київ, Україна
e-mail: shablykin@gmail.com
[1]Інститут молекулярної біології та генетики НАНУ, Київ, Україна

Протеїнкіназу СК2 розглядають як перспективну протипухлинну мішень. Тому значні зусилля дослідників були витрачені саме на розробку високоактивних селективних її інгібіторів, серед яких на сьогодні знайдені сполуки багатьох гетероциклічних класів — бензімідазолу, бензотриазолу, флавоноїдів, антрахінонів, хінолінів, а також деякі поліпептиди і полісахариди з високою інгібуючою активністю. Але пошук високоселективних, стабільних та низькотоксичних речовин все ще залишається актуальним.

Нещодавно нами був знайдений новий клас інгібіторів протеїнкінази СК2 — N-(4-тіокарбамоїл-1,3-оксазол-5-іл)-β-аланіни. Дані попередніх тестувань виявили сполуку – N-(4-тіокарбамоїл-2-феніл-1,3-оксазол-5-іл)-β-аланін, активність якої становила IC_{50} 8,0 мкМ [1]. При тестуванні ряду аналогів цієї сполуки було встановлено, що необхідними умовами для виникнення активності серед похідних 1,3-оксазолу є наявність тіоамідної групи та залишку β-аланіну в положеннях 4 та 5 відповідно, тому для пошуку більш активних інгібіторів ми обмежилися модифікацією положення 2 оксазолу. Синтезовані нові похідні оксазолу, котрі були протестовані шляхом кіназних реакцій *in vitro* з рекомбінантною протеїнкіназою СК2 людини. Для них встановлена залежність «хімічна структура – біологічна активність» (схема).



Зміна інгібуючого ефекту 4-тіокарбамоїлоксазолів по відношенню до протеїнкінази СК2 в залежності від впливу ароматичного замісника (R) в положенні 2 гетероциклу

Таким чином, зміна гідрофобності і розміру замісника суттєво впливає на активність сполук по відношенню до СК2. Для усіх синтезованих сполук був здійснений віртуальний скринінг на „кристалі" ферменту СК2, завдяки якому знайдені основні зв'язки, що виникають між інгібітором та кіназою СК2 в місці зв'язування. Для сполук (R=4-$CH_3OC_6H_4$ та R=4-BrC_6H_4) було перевірено їх специфічність до СК2. Виявилося, що вони істотно не впливать на активність багатьох інших протеїнкіназ людини (Ask1, Jnk1, C-met, Rock1, Tie2, Aurora A, FGFR). Для найбільш активної сполуки (R=4-$CH_3OC_6H_4$) була визначена токсичність ($ЛД_{50}$ 243±33 мг/кг); низька токсичність дозволяє продовжувати пошуки серед таких похідних оксазолу більш сильних інгібіторів.

Література:

1. *Шабликін О.В., Кухаренко О.П., Яковенко І.Н., Ярмолюк С.М., Броварець В.С.* Пошук специфічних інгібіторів протеїнкінази СК2 і вазоактивних сполук серед похідних 5-аміно-1,3-оксазолів// Ukr. Bioorg. Acta. - 2008. - Т. 6, № 1. - С. 28-36.

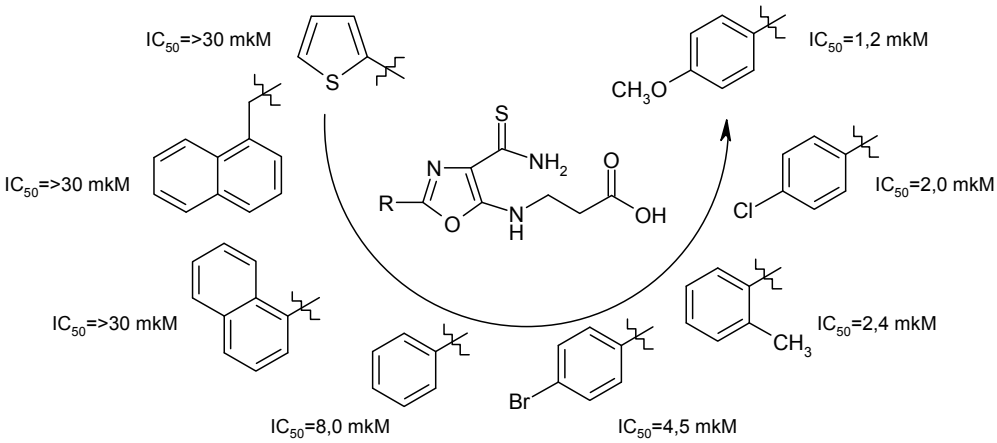
N-(2-ARYL-4-THIOCARBAMOYL-1,3-OXAZOL-5-YL)-β-ALANINES — SPECIFIC INHIBITORS OF CK2 PROTEIN KINASE

Shablykin O.V., Kozachenko O.P., [1]Ostrynska O.V., [1]Kucharenko O.P., Brovarets V.S.

Institute of Bioorganic and Petrochemistry, NAS of Ukraine, Ukraine
e-mail: shablykin@gmail.com
[1]Instituite of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Ukraine

CK2 protein kinase is seen as a promising anticancer target. A lot of effort was spent by researchers to find highly selective inhibitors of this ferment. Today, many heterocyclic compounds – benzimidazoles, benzotriazoles, flavonoids, anthraquinones, quinolines and also some polypeptides and polyhydrocarbones with high CK2 inhibitory activity have been found. Nevernheless searching for highly selective, stable substances as well as low toxicity is still topical.

Recently we found a new class of CK2 protein kinase– N-(4-thiocarbamoyl-1,3-oxazol-5-yl)-β-alanines. Data of preliminary tests showed that N-(2-aryl-4-thiocarbamoyl-1,3-oxazol-5-yl)-β-alanine has high activity of IC_{50} 8.0 mM [1]. Testing number of analogues of this compound demonstrated that the necessary condition for the appearance of activity of 1,3-oxazole derivatives is the presence of a thioamide group and a β-alanine residue in positions 4 and 5 respectively. Because of this the following searching for more active inhibitors was directed to modification of position 2 of the oxazole. New oxazole derivatives were synthesized and tested *in vitro* by kinase reactions with recombinant human CK2 protein kinase. Correlation between chemical structure and biological activity of new compounds is shown.



Correlation between CK2 protein kinase inhibitory effect of 4-thiocarbamoyloxazoles the and the nature of aromatic substitutent in position 2

Hydrophobicity and bulk of the substitutent influence the activity of CK2 inhibitors . For all synthesized compounds, virtual screening on "Crystal" CK2 enzyme was carried out and main correlations between inhibitor and CK2 kinase at a binding site were found. The CK2 specificity of the compounds with R=4-$CH_3OC_6H_4$ and R=4-BrC_6H_4 was established. It is verified that they do not significantly influence activity of such human protein kinases as Ask1, Jnk1, C-met, Rock1, Tie2, Aurora A and FGFR. The most active compound with R =4-$CH_3OC_6H_4$ and toxicity LD_{50} 243 ± 33 mg/kg was found. Such low toxicity stimulates extended search for more stronger inhibitors among the oxazole derivatives.

References:

1. *Shablykin O.V., Kucharenko O.P., Iakovenko I.N., Yarmoluk S.M., Brovarets V.S.* Search for specific protein kinase CK2 inhibitors and vasoactive compounds among 5-amino-1,3-oxazoles derivatives // Ukr. Bioorg. Acta.-2008.- Vol. 6, № 1. - P.28-36.

СПОСІБ ОТРИМАННЯ І ВЛАСТИВОСТІ ВЕЗИКУЛЯРНИХ НАНОСИСТЕМ З ФОСФОЛІПІДІВ

Шаркова Н.О., Авдєєва Л.Ю., Жукотський Е.К.

Інститут технічної теплофізики НАН України, Київ, Україна
e-mail: sharkova2007@ukr.net

Розвиток науки все більше базується на закономірностях, що стосуються об'єктів нанорівню. За останні десятиріччя вченим вдалося створити декілька сотень наноструктур, що розрізняються за складом, формою, агрегатним станом, галузями застосування, кількістю атомів і т.д.: нанокристали, нанокапсули, нанотрубки, фулерени, наносфери, полімерні міцели та ін. Відповідно до прогнозів учених створення сучасних нанотехнологій повинне призвести до прориву в самих різних галузях промисловості: енергетиці, біотехнології, медицині, харчовій промисловості і так далі [1, 2].

Одним з напрямків розвитку сучасних нанотехнологій є використання фосфоліпідних наноструктур. Способам їх одержання і використання для досліджень мембранних процесів, а також створення новітніх способів лікування та діагностики захворювань присвячена велика кількість наукових робіт в біології та медицині [3].

Переваги використання фосфоліпідних везикул, як мікрокапсул для лікувальних препаратів, привернули увагу багатьох дослідників, оскільки вони мають унікальну властивість проникати через мембрану і доставляти такі речовини безпосередньо в середину клітини тканин. Встановлено, що фосфоліпідна оболонка запобігає швидкій інактивації включених в середину везикул речовин і, таким чином, пролонгує їх дію, а матеріал що використовується для утворення везикул включається в обмінні процеси в організмі і використовуються для оновлення мембран клітин [4].

Структура і склад молекул фосфоліпідів значною мірою обумовлюють ряд їх найбільш важливих властивостей. Наявність неполярних (гідрофобних) і полярних (гідрофільних) ділянок визначають поведінку фосфоліпідів у розчинах. У рідкокристалічному стані у полярних або неполярних розчинниках фосфоліпіди самоорганізуються у замкнені везикулярні наноструктури, утворюючи подвійний шар (мембрану), що надає матеріалу нових фізичних і хімічних властивостей. Загальний принцип побудови таких агрегатів заключається в орієнтації полярних груп атомів в сторону полярної фази, а неполярних – в сторону неполярної фази. Така орієнтація амфіфільної молекули є термодинамічно вигідною і відповідає найменшому значенню енергії Гіббса у порівнянні до інших можливих варіантів орієнтування молекул.

Властивості везикулярних наносистем дозволяють розширити області їх використання і у харчовій промисловості для солюбілізації речовин у воді, для збагачення харчових продуктів мікронутрієнтами та їх захисту від дії середовища, використання для ідентифікації умов і строків зберігання. Для застосування утворених фосфоліпідних везикул у харчовій промисловості пред'являється ряд вимог: простота приготування, стабільність при зберіганні, можливість забезпечення високого відсотка захоплення необхідних речовин всередину, при цьому інкапсуляція речовин не повинна змінювати їх природних властивостей.

Існуючі на даний час методи одержання фосфоліпідних нановезикул, представляють собою складні багатоетапні процеси, особливістю яких є складність їх відтворення у промислових умовах або висока енергоємність. Аналіз процесів, що протікають при диспергуванні фосфоліпідів в розчинниках, показав необхідність здійснення ефективного розвитку і оновлення контактуючих фаз у поєднанні з інтенсивним коливанням оброблюваного середовища і з одночасною дією на неї різноспрямованих прискорень, що викликають явище розриву, диспергування частинок і так далі. Для створення раціональних умов отримання фосфоліпідних везикул нами було запропоновано використання ефекту дискретно-імпульсного введення енергії, який полягає у створенні умов, що забезпечують при локальному введенні енергії в технологічну систему її дискретний розподіл по простору і імпульсну дію за часом [5].

Нами були досліджені властивості наноструктур, утворених запропонованим способом за функцію розподілу розміру частинок методом фотонної кореляційної спектроскопії і величиною внутрішнього об'єму везикул методом флуоресцентної спектроскопії. В результаті нами були встановлені раціональні параметри технологічних режимів, при яких утворюються везикулярні наносистеми з середнім розміром 300-500 нм і внутрішнім об'ємом 12 мл на 1 г фосфоліпіду.

Література:

1. *Ковальчук М.В.* Нанотехнологии – фундамент новой наукоемкой экономики 21 века / М.В. Ковальчук // Российские нанотехнологии.– 2007. – Т.2.– №1–2.–С.6–11.
2. *Суздалев И.П.* Нанотехнология: физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов/ И.П. Суздалев .– М.: КомКнига, 2006.–592 с.
3. *Gregoriadis Gregory.* Liposome Technology /The School of Pharmacy University of London.- New York, London, 2007.-422 p.
4. Липосомы в биологических системах: Пер. с англ./Под ред. Г.Грегориадиса, А.Аллисона.-М.: Медицина, 1983.-384 с.
5. Дискретно-импульсный ввод энергии в теплотехнологиях / А.А. Долинский, Б.И. Басок, С.И. Гулый, А.И. Накорчевский, Ю.А. Шурчкова – К.: ИТТФ НАН Украины, 1996. – 204 с.

THE PROPERTIES AND THE WAY OF OBTAINING OF THE VESICULAR NANOSYSTEMS FROM PHOSPHOLIPIDS

Sharkova N.O., Avdyeyeva L.Yu., Zhukotsky E.K.

Institute of Engineering Thermophysics, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: sharkova2007@ukr.net

The development of science is mostly based on regularities concerning nanoscale objects. Over the past decade scientists succeeded in creating hundreds of nanostructures with different composition, shape, aggregate state, the application area, the number of atoms, etc.: nanocrystals, nanocapsules, nanotubes, fullerenes, nanosphere polymer micelles and others. According to forecasts of scientists the creation of modern nanotechnology should lead to a breakthrough in different industries: energy, biotechnology, medicine, food industry and so on [1, 2].

One of the developing areas of modern nanotechnology is the use of phospholipid nanostructures. A great number of scientific papers in biology and medicine is devoted to the way of their receipt and use of membrane processes for researches and to the creation of new treatments and diagnostics of deseases[3].

Advantages of using phospholipid vesicles as microcapsules for medicines, have attracted the attention of many researchers because they have a unique property to penetrate through the membrane and deliver such substances directly in the middle of the cell tissues. It is established that the phospholipid membrane prevents rapid inactivation of the substances included to vesicles and thus prolongs their effect, and the material, used for the formation of vesicles, is included in the metabolic processes of the human body updates the cell membrane [4].

The structure and composition of the phospholipid molecules determine the number of their most important properties. The presence of nonpolar (hydrophobic) and polar (hydrophilic) sites define the behavior of phospholipids in solutions. In the liquid crystal state and in polar or nonpolar solvents, phospholipids self-organize in closed vesicular nanostructures, forming a double layer (membrane), which provides material for new physical and chemical properties. The general principle of construction of such units lies in the orientation of polar groups of atoms towards the polar phase and nonpolar - towards non-polar phase. This orientation of amphiphilic molecules is thermodynamically favorable and have the smallest index of Gibbs energy compared to other options for targeting molecules.

Properties of nano-vesicular allow to broader their use in the food industry for solubilization of substances in water, for food fortification micronutrients and their protection against the environment, use for identifying the conditions and terms of storage. For the application of phospholipid vesicles formed in the food industry a number of requirements are presented: simplicity of cooking, storage stability, the possibility of capturing a high percentage of nutrients, while the encapsulation of substances should not alter their natural properties.

Nowadays existing methods of phospholipid nanovesicles I formation are complex multistage process, the basic feature of which is the complexity of their reproduction in industrial conditions or high energy. Analysis of the processes of dispersion of phospholipids in the solvent, has showed the need for effective development and updating of contacting phases in combination with intensive environment and fluctuations treated with simultaneous action on it by diverse accelerations that cause the phenomenon of rupture, dispersion of particles and so on. In order to create sustainable conditions for obtaining phospholipid vesicles the use of the effect of discrete-pulse input energy has been proposed, It creates conditions that provide a local energy input into the technological system of a discrete distribution in space and pulse action time [5].

We have studied the properties of nanostructures formed by the proposed method for the distribution of particle size by photon correlation spectroscopy and size of the internal volume of vesicles by fluorescence spectroscopy. As a result, we had established the rational parameters of technological regimes, which are formed by vesicular nanosystems with an average size of 300-500 nm and the internal volume of 12 ml per 1 g of phospholipids.

References:

1. *Ковальчук М.В.* Нанотехнологии – фундамент новой наукоемкой экономики 21 века / М.В. Ковальчук // Российские нанотехнологии.– 2007. – Т.2.– №1–2.–С.6–11.
2. *Суздалев И.П.* Нанотехнология: физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов/ И.П. Суздалев .– М.: КомКнига, 2006.–592 с.
3. *Gregoriadis Gregory.* Liposome Technology /The School of Pharmacy University of London.- New York, London, 2007.-422 p.
4. Липосомы в биологических системах: Пер. с англ./Под ред. Г.Грегориадиса, А.Аллисона.-М.: Медицина, 1983.-384 с.
5. Дискретно-импульсный ввод энергии в теплотехнологиях / А.А. Долинский, Б.И. Басок, С.И. Гулый, А.И. Накорчевский, Ю.А. Шурчкова – К.: ИТТФ НАН Украины, 1996. – 204 с.

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АНТИБИОТИКОВ НА МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ

Шестопалова А.В.

Институт радиофизики и электроники Национальной академии наук Украины, Харьков, Украина
e-mail:shestop@ire.kharkov.ua

Интерес к исследованиям взаимодействия биологически активных веществ (БАВ) с биополимерами возрастает в связи с развитием методов доклинического отбора (скрининга) новосинтезированных фармакологических препаратов. Тестирование БАВ по способности образовывать межмолекулярные комплексы с молекулой-мишенью является обязательным этапом таких испытаний. Для многих противоопухолевых, антивирусных и антибактериальных препаратов молекулой-мишенью являются нуклеиновые кислоты. Биологическое действие таких БАВ связано с нарушением основных биологических функций нуклеиновых кислот – блокированием транскрипции генов или ингибированием репликации ДНК и определяется их непосредственным взаимодействием с ДНК или РНК. Поэтому для достижения максимальной эффективности уже существующих препаратов и создания новых, важно уметь на молекулярном уровне охарактеризовать взаимодействие БАВ – нуклеиновая кислота, включая структурные особенности образующихся комплексов, термодинамику и специфичность связывания.

С помощью экспериментальных (спектроскопия, калориметрия, диэлектрометрия) и теоретических (компьютерное моделирование) физико-химических методов исследования взаимодействий в системах лиганд – биополимер получают группу параметров связывания, характеризующих энергетические и структурные особенности комплексов. Спектрофотометрические исследования в ультрафиолетовой и видимой областях позволяют наблюдать за изменением спектров при образовании разных типов комплексов БАВ – ДНК (интеркаляция и/или связывание в желобках двойной спирали) с учетом само- и гетероассоциации лигандов. Изменения биополимерной матрицы, вызванные связыванием с лигандом, изучают с помощью калориметрии (метод ДСК). Поскольку вода является неотъемлемым компонентом биологических систем, стабильность биополимеров и их комплексов с БАВ в значительной мере зависит от взаимодействий с водно-ионным окружением. Комплексообразование БАВ – молекула-мишень сопровождается освобождением молекул воды с поверхностей лиганда и биополимера, что приводит к существенному, если не определяющему, вкладу воды в энергетику связывания. С помощью анализа интенсивностей и частот полос поглощения ИК-спектров, которые чувствительны к конформационным изменениям биополимеров как при взаимодействии с молекулами воды, так и с лигандами, определяются места связывания воды и лигандов на макромолекулярной матрице. Для выяснения роли воды в комплексообразовании БАВ – молекула-мишень используют измерения диэлектрических параметров растворов БАВ, биополимеров и их комплексов, изменение которых обусловлено гидратацией молекул (КВЧ диэлектрометрия, *мм* диапазон длин волн). Методы компьютерного моделирования, используя данные экспериментов о предполагаемых типах комплексов БАВ – биополимер для создания стартовых структур как объектов моделирования, позволяют вычислить энергетические и динамические параметры комплексов, зафиксировать образование специфических водородных связей в сайтах связывания биополимера и БАВ, оценить вклад различных взаимодействий в стабильность образующихся комплексов, визуализировать их структуру. Такой комплексный подход был применен при изучении механизмов комплексообразования ДНК с серией новосинтезированных аналогов противоопухолевого антибиотика актиномицина D (производные актиноцина с разным числом метиленовых групп в боковых диметиламиноалкильных радикалах: $(CH_2)_n$, n = 2, 3, 4, 5), и позволил установить корреляцию между биологической активностью на молекулярном и клеточном уровнях [1].

Таким образом, значения констант связывания, свободные энергии связывания, параметры плавления ДНК в комплексе с лигандом, образование специфических водородных связей и водных мостиков в сайтах связывания лигандов могут быть рекомендованы как физико-химические критерии биологической активности тестируемых БАВ на молекулярном уровне. Необходимо также отметить, что объединение нескольких физико-химических методов изучения взаимодействия БАВ - биополимер позволяет исследовать эффекты медико-биологического синергизма, зафиксированные при одновременном использовании нескольких БАВ [2].

Литература:

1. *Maleev V.Ya., Semenov M.A., Kruglova E.B.* A spectroscopic and calorimetric study of DNA complexation with a new series of actinocin derivatives (ActII-ActV). В книге: Anti-cancer drug design: biological and biophysical aspects of synthetic phenoxazone derivatives. Editors: A.N.Veselkov, D.D.Davis; SEVNTU press, Sevastopol, 2002, p. 47-125.
2. *Ермак Е.Л., Круглова Е.Б.* Связывание теофиллина с тимусной ДНК в присутствии конкурирующих лигандов // Біофізичний вісник. – 2007. – Вып.19. – С. 13-19.

PREDICTION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF ANTICANCER DRUGS AT THE MOLECULAR LEVEL

Shestopalova A.V.

Usikov Institute for Radiophysics and Electronics National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine
e-mail:shestop@ire.kharkov.ua

Interest to researches of interaction of biologically active compound (BAC) with biopolymers increases in connection with development of pre-clinical screening methods of the new synthesized drugs. Testing BAC on ability to form intermolecular complexes with a molecule-target is an obligatory stage of such tests. It is wellknown that nucleic acids are molecule-target for many anticancer, anti-virus and antibacterial drugs. These drugs are thought to exert their clinical effects either by blocking the gene transcription or by inhibiting DNA replication. Therefore for achievement of peak efficiency of existing drugs and creation new ones, it is important to be able to characterize the interaction of BAC – nucleic acid at the molecular level, including, structural features of formed complexes, their thermodynamics parameters and specificity.

By means of experimental (spectroscopy, calorimetry, dielectrometry) and theoretical (computer modeling) physico-chemical methods of research of interactions in systems ligand – biopolymer one can receive group of parameters of the complex formation characterizing energetic and structural peculiar properties of complexes. UV- and Vis-spectrophotometric investigations enable to find out the complexes formation, to evaluate their association constants, to determine different types of ligand states in solution (free, self-association or hetero-association) and their bound by various ways with biopolymer matrix - intercalation or/and interactions in the grooves of double helix. The changes of a biopolymeric matrix caused by interaction with a ligand is observed by means of calorimetry (DSC) method. Since the formation of a DNA–ligand complex takes place in water environment it is essential to carry out the analysis of the role water plays in ligand binding processes and stabilization of DNA–drug complexes. The formation of a BAC – molecular-target complex is accompanied by dehydration of ligand and biopolymer surfaces that leads essential, if not defining, to the contribution of water hydration to the binding energy. The binding sites of water molecules and ligands on a matrix of biopolymers are defined by means of analysis of the IR-spectra bands intensity and frequencies which are sensitive to conformational changes of biopolymers. For receiving the information about role of water in complex formation the measurements of dielectric properties of solutions of BAC, biopolymers and their complexes was also carried out using EHF dielectrometry (*mm* waves lengths range). It has been found that there exist changes of dielectric parameters under the process of complex formation caused by hydration of molecules. The results of this experimental study allows ones to estimate hydration of compounds. Computer simulation gives the possibility to calculate energetic and dynamic parameters of complexes, to fix formation of specific hydrogen bonds in BAC – molecular-target binding sites, estimate the contribution of various interactions including hydration in stability of formed complexes, visualize their structure using the data of experiments for creation of starting structures as objects of modeling.

Such complex approach have been applied for investigations of drug-DNA complexation with the synthetic analogues of anticancer antibiotic actinomycin D (a new series of actinocin derivatives with dimethylaminoalkyl side chains of different length, containing different number of methylene groups $(CH_2)_n$, n = 2, 3, 4, 5). As a result the correlation between biological activity at the molecular and cellular levels has been established [1].

Thus, values of binding constants, binding free energy, parameters of DNA melting in a complex with a ligand, formation of specific hydrogen bonds and water bridges in binding sites of ligands can be recommended as physico-chemical criteria of biological activity tested BAS at the molecular level. It is necessary to notice that combination of some traditional and original physical methods listed above allows to investigate effects of medical and biologic synergism observed at simultaneous application of several drugs [2].

References:

1. *V.Ya. Maleev, M.A. Semenov, E.B. Kruglova.* A spectroscopic and calorimetric study of DNA complexation with a new series of actinocin derivatives (ActII-ActV). In boook: Anti-cancer drug design: biological and biophysical aspects of synthetic phenoxazone derivatives. Editors: A.N.Veselkov, D.D.Davis; SEVNTU press, Sevastopol, 2002, p. 47-125.
2. *Iermak Ie.L., Kruglova O.B.* Binding of teofilline to calf thymus DNA in presence of competing ligands // Biophysical Bulletin. – 2007. – N.19. – P. 13-19.

СИНТЕЗ [d]-ПИРИМИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ТИОПИРАН-3-ОН 1,1-ДИОКСИДА И ИЗОТИОХРОМАН-3-ОН 2,2-ДИОКСИДА

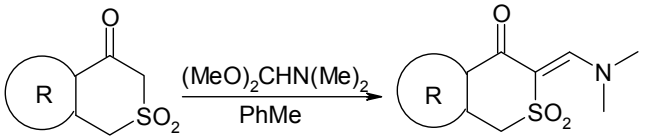
Шишкина Е.О., Ткачук Т.М., Коваленко Н.В., Листунов Д.П., Воловенко Ю.М.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина
e-mail: shishkina_lo@mail.ru

Прогресс в фармацевтической и медицинской химии во многом зависит от доступности для фармакологических испытаний большого разнообразия новых структур. Большой интерес к химии β-кетосульфонов обусловлен широким спектром биологической активности этих соединений [1-3].

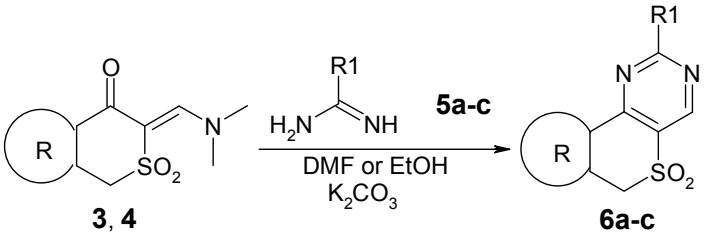
Цель настоящей работы состоит в изучении реакционной способности 2[(диметиламино)метилен]-дигидро-*2H*-тиопиран-3(*4H*)-он 1,1-диоксида **3** и (*3Z*)-3[(диметиламино)метилен]-*1H*-изотиохромен-4(*3H*)-он 2,2-диоксида **4** с азотсодержащими нуклеофилами .

При формилировании тиопиранона **1** и изотиохроманона **2** ацеталем диметилформамида образуются енаминокетоны **3** и **4**.



1, **2** R=C_6H_4 **3**, **4**

При взаимодействии енаминокетонов **3** и **4** с амидинами **5a-c** в ДМФА или этиловом спирте в присутствии поташа были получены соответствующие производные пиримидина **6a-c** и **7a-c**.



3, **4** R=C_6H_4 R1: (a) NH_2; (b) Me; (c) Ph **6a-c** **7a-c**

Структуры всех соединений были доказаны с помощью данных ИК- и ЯМР-спектроскопии, а структуры **2** и **4** доказаны с помощью РСИ.

Виртуальный скрининг соединений **6a-c** и **7a-c** по видам фармакологического действия, проведенный по программе PASS, показал, что эти соединения целесообразно проверять как ингибиторы Na / желчные кислоты переносчиков и как ингибиторы обратного захвата нейромедиаторов.

Литература:

1. Patent Specification. // Isothiochroman carboxamides, USA, 1259415.
2. *K. Vandyck, M. D. Cummings, O. Nyanguile, C. W. Boutton, S. Vendeville, D. McGowan, B. Devogelaere, Katie. Amssoms, S. Last,K. Rombauts, A. Tahri, P. Lory, L. Hu, D. A. Beauchamp, K. Simmen, P. Raboisson.* // Structure-Based Design of a BenzodiazepineScaffold Yields a Potent Allosteric Inhibitor of Hepatitis C NS5B RNA Polymerase - J. Med. Chem., 2009, vol. 52, 4099-4102.
3. *I. Drizin, M. W. Holladay, Lin Yi, H. Q. Zhang, S. Gopalakrishnan, M. Gopalakrishnan, K. L. Whiteaker, S. A. Buckner, J. P. Sullivan,W. A. Carroll.* // Structure–Activity Studies for a Novel Series of Tricyclic Dihydropyrimidines as K_{ATP} Channel Openers (KCOs) - Bioorg. Med. Chem., 2002, vol. 12, 1481-1484.

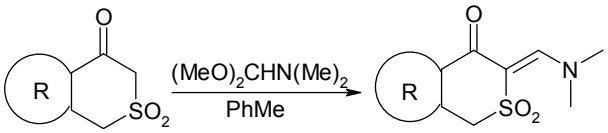
SYNTHESIS [d]-PYRIMIDINE DERIVATIVES THIOPYRAN-3-ONE 1,1-DIOXIDE AND ISOTHIOCHROMAN-3-ONE 2,2-DIOXIDE

Shyshkina O.O., Tkachuk T.M., Kovalenko N.V., Listunov D.P., Volovenko Y.M.

Kyiv Taras Shevchenko University, Kyiv, Ukraine
E-mail: shishkina_lo@mail.ru

Progress of the pharmaceutical and medicinal chemistry depends on availability of large variety new structures for pharmacological examination. In particular the derivatives of the thiopyran-3-one 1,1-dioxide **1** and isothiochroman-4-one 2,2-dioxide **2** are of special interest for researchers due to their diverse biological activity [1-3].

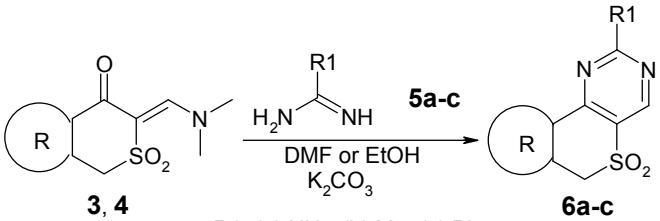
Therefore we have studied the reactions of compounds **1** and **2** with 1,1-dimethoxy-N,N-dimethylmethanamine leading to 2-[(dimethylamino)methylene]-dihydro-*2H*-thiopyren-3(*4H*)-one 1,1-dioxide **3** и (*3Z*)-3[(dimethylamino)methylene]-*1H*-isothiochromen-4(*3H*)-one 2,2-dioxide **4** and their further reactions with nitrogen containing nucleophylic reagents.



1, **2**
R=C_6H_4

3, **4**

Condensation of the enaminoketones **3**, **4** with amidines **5a-c** in DMF or EtOH with K_2CO_3 resulted in corresponding pyrimidine 5,5-dioxide derivatives **6a-c** and **7a-c**.



3, **4**
R=C_6H_4

R1: (a) NH_2; (b) Me; (c) Ph

6a-c
7a-c

The structure of all compounds has been proved by IR- and NMR-spectroscopy data and X-ray diffraction study by compounds **2** and **4**.

Neurotransmitter uptake inhibitor and sodium/bile acid cotransporter inhibitor activities and perspectives for investigations *in vitro* of the compounds **6a-c** and **7a-c** have been shown using the program PASS.

Reference:

1 Patent Specification. // Isothiochroman carboxamides, USA, 1259415.

2 *K. Vandyck, M. D. Cummings, O. Nyanguile, C. W. Boutton, S. Vendeville, D. McGowan, B. Devogelaere, Katie. Amssoms, S. Last,K. Rombauts, A. Tahri, P. Lory, L. Hu, D. A. Beauchamp, K. Simmen, P. Raboisson.* // Structure-Based Design of a BenzodiazepineScaffold Yields a Potent Allosteric Inhibitor of Hepatitis C NS5B RNA Polymerase - J. Med. Chem., 2009, vol. 52, 4099-4102.

3 *I. Drizin, M. W. Holladay, Lin Yi, H. Q. Zhang, S. Gopalakrishnan, M. Gopalakrishnan, K. L. Whiteaker, S. A. Buckner, J. P. Sullivan,W. A. Carroll.* // Structure–Activity Studies for a Novel Series of Tricyclic Dihydropyrimidines as K_{ATP} Channel Openers (KCOs) - Bioorg. Med. Chem., 2002, vol. 12, 1481-1484.

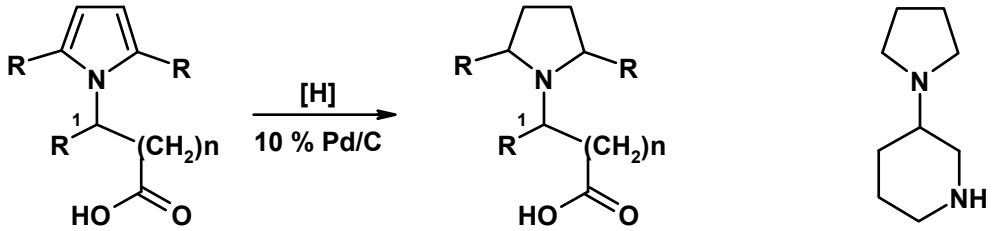
КАТАЛІТИЧНЕ ГІДРУВАННЯ ПІРОЛІВ В СИНТЕЗІ БІОПЕРСПЕКТИВНИХ ПОХІДНИХ ПІРОЛІДИНУ

Штиль Н. А., Чайковська О. О., Юрченко О. О., Лахтадир О. І., Юрченко С. О., Смалій Р. В., Костюк О. М.

Інститут органічної хімії НАН України, Київ, Україна
e-mail: Chaikoff2005@ukr.net

Піролідиновий фрагмент є базисною структурою багатьох біологічно активних сполук . Серед похідних N-піролідинкарбонових кислот знайдені речовини, які мають нейропротекторну активність [1], використовуються для лікування гепатиту С [2], гіпертензії та серцевої недостатності [3,4], як антагоністи протеїназо активованих рецепторів [5], а також мають активність при поверхневій анестезії [6]. 3-(1-Піролідиніл)-піперидин є вихідною сполукою для синтезу речовин, що використовуються як ефективні ліганди високочутливих δ-рецепторів [7], а також як препарати для лікування розладів центральної нервової системи, таких як ішемія головного мозку, психози та конвульсії [8].

Одним із методів отримання похідних піролідину є відновлення пірольного циклу, яке проходить в жорстких умовах при використанні малодоступних каталізаторів. Нами розроблено зручний метод каталітичного гідрування піролів **(1, 2)** на 10% Pd/C з отриманням низки N- піролідинкарбонових кислот (**3)** та раніше вкрай важкодоступного 3-(1-піролідиніл)-піперидину (**4)** з високим виходом.



1, 2 **3** **4**

1: R= CH_3, CH_2Ph, n= 0, R_1= H, CH_3, C_2H_5
2: R= H, n= 0, 1, 2, R_1= H, CH_3, C_2H_5

Література:
1. Patent WO 2007/036730 A1 5 Apr. 2007 A. Ayscough, D. Owen, P. Meo, D. Pearson, Y. Walker, R. Boyce, F. Zuccotto.
2. US Patent 2008/0188458 A1 7 Ayg. 2008 K.-S. Yeung, J. Kadow, K. Grant-Young.
3. *Giabatti R., Tarzia G., Battaglia F., Barone D., Baldoli E.* // Angiotensin converting enzyme inhibitory activity – Farmaco, 1988. p. 989-1004.
4. US Patent 4,140,793 20 Feb. 1979 T. Ward.
5. Patent WO 2007/076055 A2 5 Jul. T. Hembrough, G. Agoston, A. Treston, A. Hanson.
6. *Косточка Л. М., Мочаловский С. Е., Чернякова И. В., Сколдинов А. П., Жуков В. Н.* // Синтез и анестезирующая активность ацетомезидидов, содержащих фрагменты тропана и пиперидина – Хим.-фарм. журн., 1989, Т. 23, № 6, с. 684-686.
7. *Costa B.R., Dominguez C., He X., Williams W., Radesca L., Bowen W.* // Synthesis and biological evalution of conformationally restricted 2-(1-pyrrolidinyl)-N-[2-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]-N-methylethylenediamines as δ receptor ligands/1/ Pyrrolidine, piperidine, homopiperidine, and tetrahydroisoquinoline classes – J. Med. Chem., 1992, Vol.35, p. 4334-4343.
8. U.S. Patent US005346908A 13 Sep. 1994. W. Bowen, B. de Costa, C. Dominguez,X.-S. He, K. Rice.

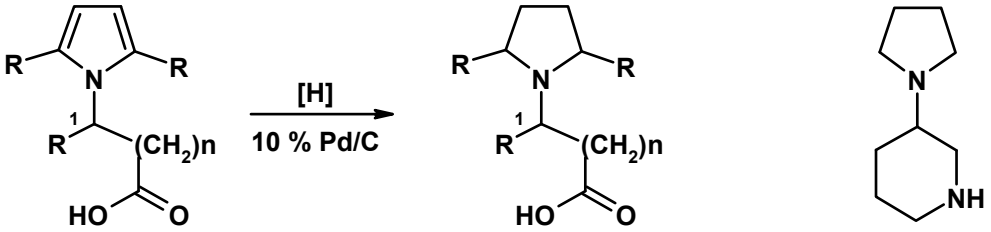
CATALYTIC HYDROGENATION OF PYRROLES IN THE SYNTHESIS OF BIOPERSPECTIVE DERIVATIVES OF PYRROLIDINE

Shtil N. A., Chaikovska O. O., Yurchenko O. O., Lahtadyr O. I., Yurchenko S. O., Smaliy R. V., Kostyuk O.M.

Institute of Organic Chemistry of NAS Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: Chaikoff2005@ukr.net

Pyrrolidine fragment is a basic structure of many biologically active compounds. Among derivatives of N-pyrrolidinecarboxylic acids found as substances that have neuroprotective activity [1], useful to treatmeant of virus HCV [2], hypertension and cardiac insufficiency [3,4], as proteinase activated receptor antagonists [5], and also as anesthetic agents [6]. 3 - (1-Pirolidynil)-piperidine is a starting compound for the synthesis of substances used as highly effective ligands of δ-receptors [7], as well as drugs to treatmeant of central nervous system disorders such as cerebral ischemia, psychosis and convulsions [8] .

One of the methods of obtaining derivatives of pyrrolidines is reduction of pyrrole cycle, which is carried out under harsh conditions using inaccessible catalysts. We have developed a convenient method of catalytic hydrogenation of pyrroles **(1, 2)** using 10% Pd / C to obtain a series of N-pyrrrolidinecarboxylic acids **(3)** and hardly accessible 3 - (1-pirolidynil) piperidine **(4)** in high yield.



1, 2 **3** **4**

1: R= CH_3, CH_2Ph, n= 0, R_1= H, CH_3, C_2H_5
2: R= H, n= 0, 1, 2, R_1= H, CH_3, C_2H_5

References:

1. Patent WO 2007/036730 A1 5 Apr. 2007 A. Ayscough, D. Owen, P. Meo, D. Pearson, Y. Walker, R. Boyce, F. Zuccotto.
2. US Patent 2008/0188458 A1 7 Ayg. 2008 K.-S. Yeung, J. Kadow, K. Grant-Young.
3. *Giabatti R., Tarzia G., Battaglia F., Barone D., Baldoli E.* // Angiotensin converting enzyme inhibitory activity – Farmaco, 1988. p. 989-1004.
4. US Patent 4,140,793 20 Feb. 1979 T. Ward.
5. Patent WO 2007/076055 A2 5 Jul. T. Hembrough, G. Agoston, A. Treston, A. Hanson.
6. *Kostochka L. M., Mochalovskiy S. E., Chernyakova I. V., Scoldinov A. P., Zhukov V. N.* // Khim.-Pharm. zhurn., 1989, T. 23, № 6, P. 684-686.
7. *Costa B.R., Dominguez C., He X., Williams W., Radesca L., Bowen W.* // Synthesis and biological evalution of conformationally restricted 2-(1-pyrrolidinyl)-N-[2-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]-N-methylethylenediamines as δ receptor ligands/1/ Pyrrolidine, piperidine, homopiperidine, and tetrahydroisoquinoline classes – J. Med. Chem., 1992, Vol.35, p. 4334-4343.
8. U.S. Patent US005346908A 13 Sep. 1994. W. Bowen, B. de Costa, C. Dominguez,X.-S. He, K. Rice.

РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ УПАКОВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ РАСТЕНИЙ В БИОСОВМЕСТИМЫЕ МАТРИЦЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ

[1]Шутова А.Г., [2]Шутова Т.Г., [2]Агабеков В.Е.

[1]ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь
e-mail: anna_shutova@mail.ru
[2] ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Использование биологически активных веществ (БАВ) растений в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности имеет ряд трудностей, связанных с высокой чувствительностью БАВ к свету, температуре, условиям хранения и сложностью дозирования малых количеств многокомпонентных смесей с варьирующейся в широких пределах растворимостью индивидуальных соединений в ряде сред. Микрокапсулирование экстрактов и эфирных масел растений в матрицы из природных полимеров, обладающих кроме того собственной биоактивностью, позволяет преодолеть эти трудности и добиться контролируемого высвобождения биологически активных веществ за счет регулирования проницаемости оболочки или деградации матрицы [1]. Выбор материала микрокапсул (альгиновая кислота, хитозан, каррагинан и др.) и эмульгаторов основывается на допустимости их использования в составе косметических и пищевых продуктов.

С целью поиска оптимальных условий включения эфирных масел в микрочастицы на основе альгиновой кислоты предложены три способа получения биосовместимых матриц полисахаридов, пригодных для совмещения с эфирными маслами растений, а именно:

1) формирование капсул-жемчужин путем выкапывания эмульсии эфирного масла в 3-10% растворе альгиновой кислоты в желирующий раствор, содержащий ионы кальция и хитозан, через отверстие заданного диаметра,

2) формирование оболочки на основе неорганических наночастиц и полимерных электролитов на микрокаплях эфирного масла путем последовательного чередующегося добавления небольших количеств оксида кремния, альгиновой кислоты, хитозана и полиэтиленимина,

3) коацервация микрочастиц альгиновой кислоты/эмульгатор/эфирное масло в растворах сахарозы или полиэтиленгликоля с последующим сшиванием ионами кальция и оболочкой хитозан/оксид кремния для дополнительной стабилизации.

Коацервацией микрочастиц альгиновой кислоты/эмульгатор/эфирное масло в вязких растворах сахарозы в кислых средах получены образцы микрочастиц, содержащих эфирное масло растений, диаметр которых не превышает 20 мкм, в том числе дополнительно покрытые оболочкой хитозан/оксид кремния.

Проанализировано влияние концентрации сахарозы в дисперсионной среде и природы эмульгатора на долю масла, удерживаемого в материале микрочастиц, и выход микрокапсулированного материала. При использовании смеси желатина А и яичного лецитина в качестве эмульгатора концентрация эфирного масла в микрочастицах увеличивалась с увеличением объема масла, использованного для формирования микрочастиц, в смеси компонентов.

Получены концентрированные дисперсии микрочастиц, содержащих до 0,015 мл смеси эфирных масел чайного дерева и чабера горного (9:1 по объему) на 1 г влажного материала, или 0,5 мл смеси масел в пересчете на 1 г сухого веса микрочастиц. При использовании раствора сахарозы с концентрацией 50 масс. % для эмульгирования эфирного масла эффективность капсулирования являлась максимальной и достигала 80 %. Органолептические свойства образцов, содержащих эфирное масло, полученных с использованием 50 масс % и 70 масс % сахарозы выше, чем при использовании водных эмульсий эфирного масла.

При лиофильной сушке концентрация эфирного масла в порошке уменьшается по сравнению с микрочастицами в растворе. Максимальная загрузка не превышает 0,16-0,20 мл масла на 1 г сухого порошка, однако, этого количества достаточно для обеспечения хороших органолептических свойств. Высокая концентрация сахарозы при эмульгировании эфирных масел способствует сохранению масла в порошке в процессе лиофильной сушки. Дополнительная оболочка хитозан/оксид кремния незначительно увеличивает выход микрочастиц в пересчете на сухой вес. При этом на 10-15% увеличивается доля включенного в микрочастицы эфирного масла.

Высвобождение компонентов эфирного масла чабера горного с высокой антиоксидантной активностью [2] из микрочастиц альгиновой кислоты носит пролонгированный характер. Время, через которое достигается максимальное обесцвечивание раствора катион-радикала (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин - 6-сульфоновой кислоты) АБТС$^{+\bullet}$, зависит от типа эмульгатора, причем для микрочастиц, полученных на основе лецитинов, додецилсульфата натрия и дополнительно покрытых оболочкой хитозан/оксид кремния, реакция продолжается более 120 ч, по сравнению с 0,5 ч в растворе.

Литература:

1.*Z. Fang, B. Bhandari* // Encapsulation of polyphenols: a review - Trends in Food Sc. & Tech., 2010, т. 21, с. 510-523.
2.*А.Г.Шутова* //Антирадикальная активность эфирных масел и входящих в их состав терпеновых и фенольных соединений в различных средах - Весці Нац. акадэміі навук Беларусі. Серыя біял. навук, 2009, № 4. с. 5 – 10.

DEVELOPMENT OF APPROACHES OF PLANT BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES ENCAPSULATION IN BIOCOMPATIBLE MATRIXES FOR PROLONGED RELEASE PREPARATIONS

[1]Shutava H., [2]Shutava T., [2]Agabekov V.E.

[1] Central Botanical Garden of Belarus, Minsk,
e-mail: anna_shutova@mail.ru
[2] Institute of Chemisty of New Materials National Academy of Sciences of Belarus, Minsk

Microencapsulation of plants extracts and essential oils into natural polymer matrixes allows to overcome their light and temperature sensitivity and easily dispense small quantities of these mixtures with highly varying solvent dependent solubility of individual compounds in further applications. Release of the biologically active substances is achieved through environmentally sensitive permeable coating or matrix degradation [1]. The choice of encapsulating materials and emulsifiers is based on their acceptability for cosmetic and food products.

Three approaches to preparation of alginic acid matrixes compatible with essential oils inclusion have been proposed: 1) beads by dripping essential oil emulsions in 3-10 % alginic acid into a calcium ions and/or chitosan bath through a fine needle; 2) shells on the basis of polymeric electrolytes (alginic acid, chitosan, and polyethyleneimine) and inorganic nanoparticles (silica) formed on oil microdroplets by layer-by-layer assembly; 3) coacervation of alginic acid/ emulsifier/ essential oil microparticles in viscous sucrose or polyethyleneglycol solutions followed by calcium cross-linking and further stabilization with a chitosan/SiO_2 coating. The latter approach allows for synthesis of less than 20 μm diameter microparticles.

The effect of sucrose concentration in dispersive medium and emulsifiers on oil retention in the particulate and the yield of encapsulated material is analyzed. While gelatin/lecithin mixture is used as an emulsifier, essential oil concentration in microparticles increases with increasing oil fraction in the mixture of components. Concentrated dispersions containing up to 0.015 ml/g of tea tree/ winter savory (9 to 1 by volume) essential oils in damp material, or ca. 0.5 ml/g on dry weight basis, are obtained. Oil entrapment efficacy was maximum (ca. 80 %) in 50 % sucrose.

Freeze drying decreases essential oil concentration in powder as compared with the microparticles in solution, but high sucrose concentration upon emulsification promotes its retention. The maximum oil loading in dry powder does not exceed 0.16-0.20 ml/g, however, it is enough to sustain its good organoleptic properties. Increasing essential oil loading by 10-15 %, the chitosan/SiO_2 coating increases slightly the microparticles yield.

Sustain release of winter savory essential oil components with high antioxidant activity [2] from microparticles is observed. The time of a 2,2'-azino-bis(3-ethylbenztiazoline-6-sulphonic acid) cation-radical ($ABTS^{+\bullet}$) solution maximum discoloration depends on the emulsifier used. For the microparticles based on lecithin, sodium dodecylsulfate and coated with a chitosan/SiO_2 shells, the reaction proceeds more than 120 h, while it continues only 0.5 h in solution.

References:

1. *Z. Fang, B. Bhandari* // Encapsulation of polyphenols: a review - Trends in Food Sc. & Tech., 2010, v. 21, P. 510-523.
2. *A.G. Shutova* //Radical scavenging activity of essential oils. Proceedings of NAS of Belarus, 2009, № 4. P.5–10.

СОЕДИНЕНИЯ N-ФЕНИЛБЕНЗОХИНОЛИНИЕВОГО РЯДА – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ МАРКЕРЫ

[1]Щепина Н.Е., [1]Александрова Г.А., [2]Бойко И.И.

[1] Естественнонаучный институт Пермского госуниверситета, Пермь, Россия
e-mail: neshchepina@mail.ru
[2] ООО «Технолог», Переславль-Залесский, Россия

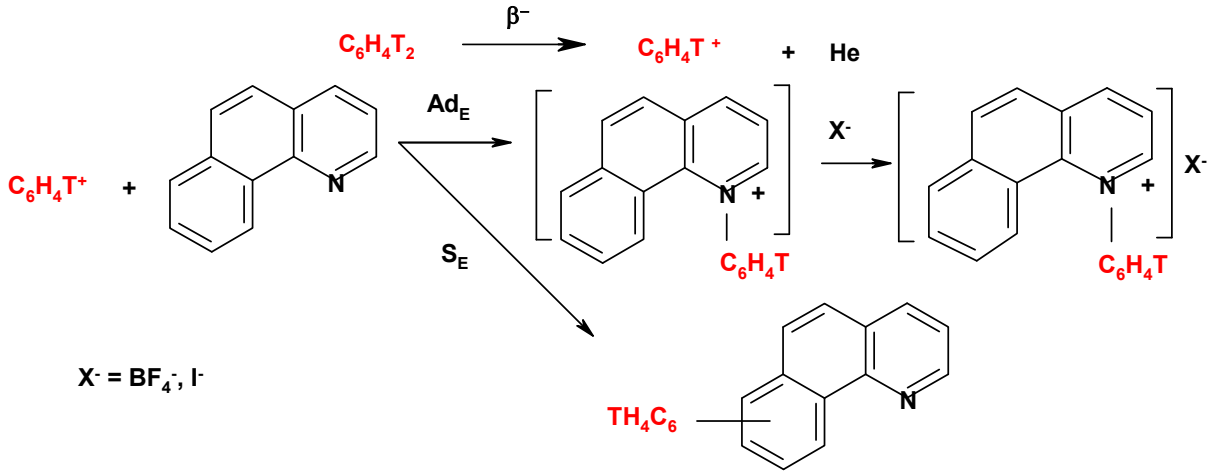
В настоящее время существует множество полирезистентных микроорганизмов, устойчивых к действию большинства химиотерапевтических препаратов. Развитие устойчивости к антисептикам и дезинфектантам, особенно у госпитальных штаммов, является важным фактором, способствующим распространению внутрибольничной инфекции. В связи с этим изыскание новых потенциальных противомикробных средств должно быть направлено на поиск более эффективных препаратов.

Предыдущими исследованиями нами была показана перспективность противомикробной активности в N-фенильных производных бензохинолиниевого ряда при расширенном их изучении. Синтезированный нами борфторид N-фенил, 2-метил-бензохинолиния показал эффективность при воздействии на музейные тест-штаммы условно-патогенных культур: *Salmonella spp., Staphylococcus saprophyticus, Micrococcus luteus, Proteus vulgaris, Basillus subtilis, Candida albicans.*

Особое внимание в этом перечне заслуживают дрожжеподобные грибки *Candida albicans*. Грибы рода *Candida* являются представителями “нормофлоры” человека, однако при определенных условиях они могут включаться в ассоциацию микробов населяющих, например, слизистые оболочки дыхательных путей и, таким образом, отягощать течение ряда заболеваний (например, фарингит, вызванный стафилококковой инфекцией).

Продолжение исследований в данном направлении - изучение противомикробных свойств борфторида N-фенил, 2-метил-бензохинолиния было осуществлено уже на 6-ти клинически выделенных штаммах *Candida albicans.* В экспериментах его активность была выявлена в концентрациях 15,6 - 31,2 мкг/мл (2 штамма *Candida albicans*- возбудителя молочницы) и 62.5 мкг/мл-(4 штамма *Candida albicans*- возбудителя кандидозного вульвовагинита). Таким образом, противогрибковая активность исследованного препарата была показана как на музейных, так и на клинически выделенных штаммах *Candida albicans.* Различные растворители (ДМСО, ацетонитрил, вода), использованные при разведениях соединения, не повлияли на уровень эффективности препарата.

Введение радиоактивной метки в биологически активные соединения позволяет проводить детальные исследования механизма бактерицидного действия препарата. К сожалению, синтез меченых соединений представляет существенные трудности. Разработанный нами ядерно-химический метод позволяет осуществлять одностадийный синтез сложных N-фенилзамещенных шестичленных гетероциклических производных азота, меченных тритием. Метод основан на взаимодействии нуклеогенных фенил-катионов, генерируемых при β-распаде трития в *п*-дитритийбензоле, с неподеленной электронной парой атома азота гетероциклического соединения. Схема ядерно-химического синтеза фенилзамещенных бензохинолиниевых производных может быть представлена следующим образом:



Разработанный нами метод был с успехом применен для одностадийного получения неизвестных солей N-фенил-бензо(7,8)хинолиния, меченных тритием, перспективных радиоактивных маркеров при изучении механизма подавления дрожжеподобных грибков *Candida albicans.*

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№10-03-00685)

DERIVATIVES OF N-PHENYLBENZOQUINOLINIUN – PERSPECTIVE ANTIMICROBIAL MARKERS

[1]Shchepina N.E., [1]Alexandrova G.A., [2]Boiko I.I.

[1] Natural Sciences Institute of Perm State University, Perm, Russia
e-mail: neshchepina@mail.ru
[2] OOO "Tekhnolog", Pereslavl-Zalessky, Russia

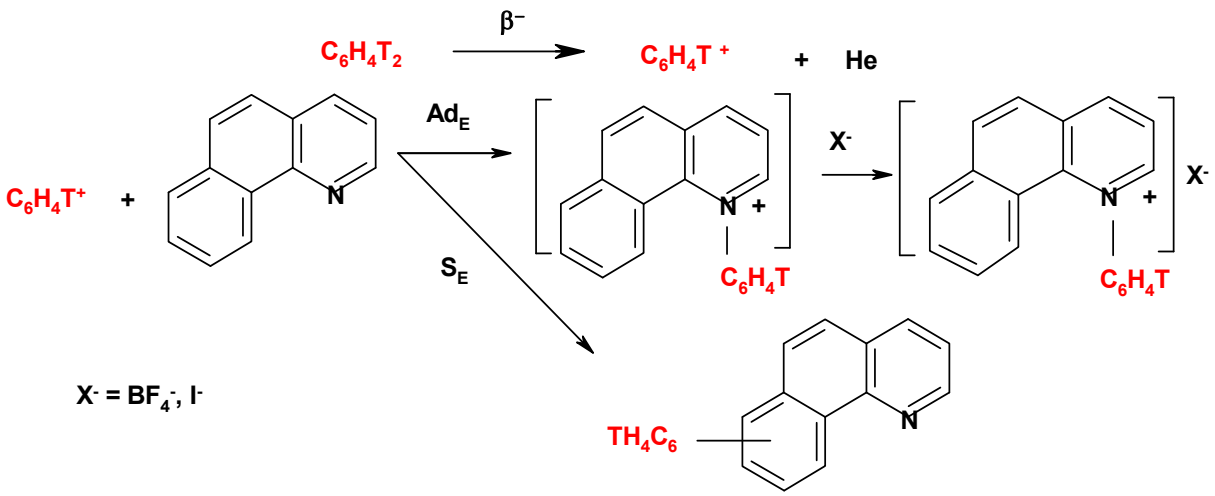
Nowadays exist plenty of polyresistant microorganisms which are stable to the action of chemical therapeutic medications. Evolution of resistance towards antiseptics and disinfectants, especially of hospital cultures becomes an important factor which can assist in intrahospital infection. In this connection pioneering in potentially new antimicrobial remedies must be focused on more effective aseptic medications.

In previous investigations we have shown availability of antimicrobial activity of N-phenylbenzoquinolinium derivatives at their multiphasic screening. Synthesized tetrafluoroborate of N-phenyl, 2-methyl-benzoquinolinium revealed effectiveness towards museum test-cultures of relatively pathogenic cultures: *Salmonella spp., Staphylococcus saprophyticus, Micrococcus luteus, Proteus vulgaris, Basillus subtilis, Candida albicans.*

Special attention in this list can be attributed to the yeast-like fungus *Candida albicans*. The funguses of *Candida* genus are human standard flora, but under some circumstances it may include into microbe association which is inhabited, for example, in the mucous capsules of respiratory tract, and in that way to overburden clinical course of some diseases (such as pharyngitis caused by staphylococcic infection).

Sequel investigations in this field - study of the antimicrobial features of N-phenyl, 2-methyl-benzoquinolinium tetrafluoroborate was accomplished on the 6 clinical cultures of *Candida albicans.* In these experiments its activity was in the 15,6 - 31,2 mcg/ml concentrations interval (2 cultures of *Candida albicans* – pathogen of thrush) and 62,5 mcg/ml (4 cultures of *Candida albicans* – pathogen of candidiasis vulvovaginitis). So we can ascertain that antimicrobial activity of the investigated chemical has been shown towards both museum and clinical cultures of *Candida albicans*. Variation of solvents (DMSO, acetonitrile, water) which were used for substance dilution had no influence on the range of substrate bactericidal effectiveness.

Radioactive labeling of biologically active substances allows carry out detailed investigations of mechanism of chemicals bactericidal action. Unfortunately, synthesis of labeled compounds occurs essential difficulties. Elaborated nuclear-chemical method allows fulfill one-pot synthesis of tritium labeled complicated N-phenyl substituted six-ring heterocyclic nitrogen derivatives. The method is based on ion-molecular reactions of nucleogenic phenyl cations, generated by tritium β-decay in *p*-ditritiobenzene, with nitrogen lone pair of electrons of heterocyclic compound. The scheme of nuclear-chemical synthesis of phenyl substituted benzoquinolinium derivatives may be represented in follows:



Elaborated method has been successfully applied for one-pot preparation of tritium labeled unknown N-phenyl-benzo(7,8)quinolinium salts, perspective radioactive markers for investigation of suppression mechanism of yeast-like fungus *Candida albicans*.

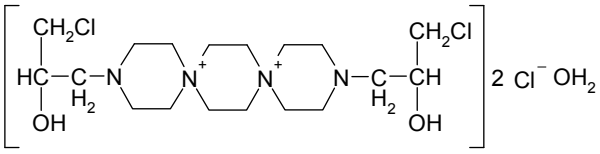
Investigations have been carried out under support of the RFBR grant (№10-03-00685)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИДРОГЕЛЕЙ ФОСФАТОВ ДЕКСТРАНА ДЛЯ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ПРОСПИДИНА

Юркштович Т.Л., Голуб Н.В., Кладиев А.А., Алиновская В.А., Бычковский П.М., Костерова Р.И., Беляев С.А.

Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», Минск, Беларусь
e-mail: Natali.Golub@tut.by

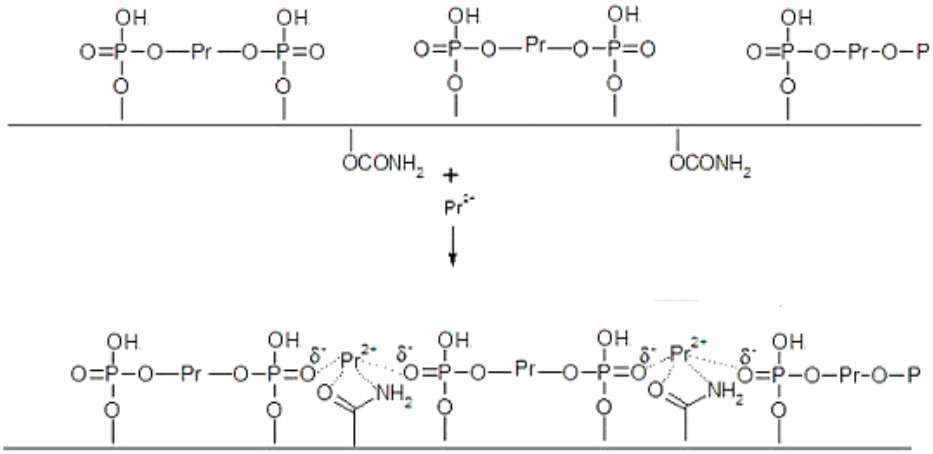
Отечественный противоопухолевый препарат проспидин, [дихлорид N,N3-ди(γ-хлор-β-оксипропил)-N1, N2-диспиротрипиперазиния]:



характеризуется хорошей переносимостью больными, большим диапазоном доз, при которых проявляется терапевтическое действие препарата без побочных явлений. Проспидин используется при лечении рака гортани, кожных ретикулезов, рака мочевого пузыря и других видов злокачественных новообразований. Однако биологическая доступность терапий с использованием проспидина ограничена быстрым исчезновением из крови при внутривенном введении, что препятствует достижению максимального лечебного действия. В связи с этим, возможность поддержания действующей концентрации проспидина в крови в течение длительного времени, а также получение новой лекарственной формы цитостатика для локальной терапии различных патологических процессов является важной и актуальной задачей. Одним из перспективных направлений создания инъекционных систем с пролонгированным высвобождением биологически активных веществ (БАВ) является включение их в состав гидрогелей.

Цель данной работы – получение и исследование медико-биологических свойств проспидина, включенного в состав анионных полимеров-носителей. В качестве таких носителей были использованы гелеобразующие фосфаты декстрана, которые получали путем этерификации полисахарида ортофосфорной кислотой в расплаве мочевины.

Установлено, что иммобилизация проспидина на фосфате декстрана осуществляется за счет ионных и донорно-акцепторных связей:



где Pr^{+2} - молекула проспидина, а также распределения внешнего раствора между двумя фазами.

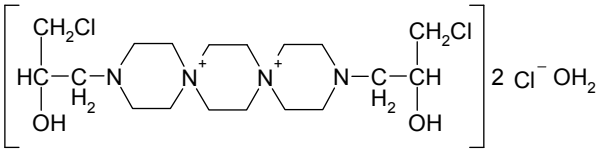
На основании медико-биологических испытаний, проведенных на белых беспородных крысах с перевитыми саркомой М-1, саркомой Йенсена и гепатомой Зайделя, установлено, что гелеобразующий препарат на основе проспидина является более эффективным по сравнению с инъекционной формой и обладает более длительным периодом действия.

THE USE OF HYDROGELS PHOSPHATE DEXTRAN FOR PROLONGED RELEASE PROSPIDINUM

Yurkshtovich T.L., Golub N.V., Kladiev A.A., Alinovskaya V.A., Bychkovsky P.M., Kosterova R.I., Belyev S. M.

The establishment of the Byelorussian State University "Research institute of physical-chemical problems", Minsk, Belarus,
e-mail: Natali.Golub@tut.by

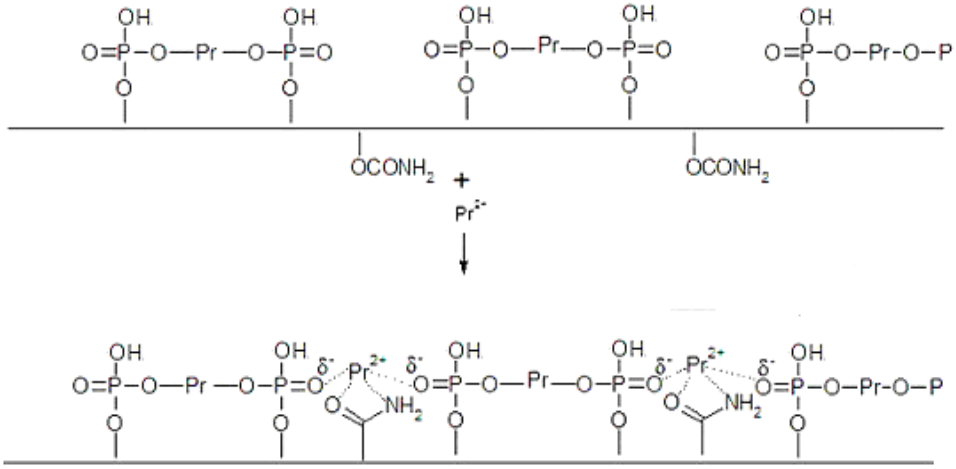
Domestic anticancer prospidinum [dichloride, N, N^3-di (γ-chloro-β-hydroxypropyl)-N^1, N^2 - dispirotripiperaziniya]



is well tolerated of patients and have a large range of doses at which manifests therapeutic effects of the drug without side effects. It is known, that prospidinum has been used successful for the treatment of cancer larynx, skin reticulosis, bladder cancer and others. At the same time, the bioavailability of prospidinum therapies is limited by the rapid clearance from the blood, which prevents the achievement of the maximum therapeutic action. In this regard, the ability to maintain prospidinum concentration in the blood for a long time, and the preparing new dosage form of cytostatic for local therapy of various pathological processes is an important and urgent task. The one of the promising direction of creating intraperitoneally systems with sustained release of biologically active substances (BAS) is to include them in the hydrogels.

The purpose of presented work is a receiving a new effective anticancer drug form containing prospidinum, study it biomedical properties. As these carriers was used phosphate dextran were prepared by esterification of polysaccharide with phosphoric acid in molten urea at 125ºC

It was established that immobilization of the prospidinum by phosphate dextran is due to ionic, donor-acceptor bonds and interphase distribution of the prospidinum solution.



In vivo preclinical studies have shown, that the prospidinum immobilized on the biodegradable hydrogels of phosphates dextran turned out to are more active against a variety of experimentally-induced tumors in rats (sarcoma M-1 sarcoma Jensen and hepatoma Seidel), than their injections.

ПОЛУЧЕНИЕ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФОСФАТОВ КРАХМАЛА И ДЕКСТРАНА

Юркштович Т.Л., Голуб Н.В., Юркштович Н.К., Алиновская В.А., Костерова Р.И., Бычковский П.М.

Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», Минск, Беларусь
e-mail: Natali Golub@tut.by

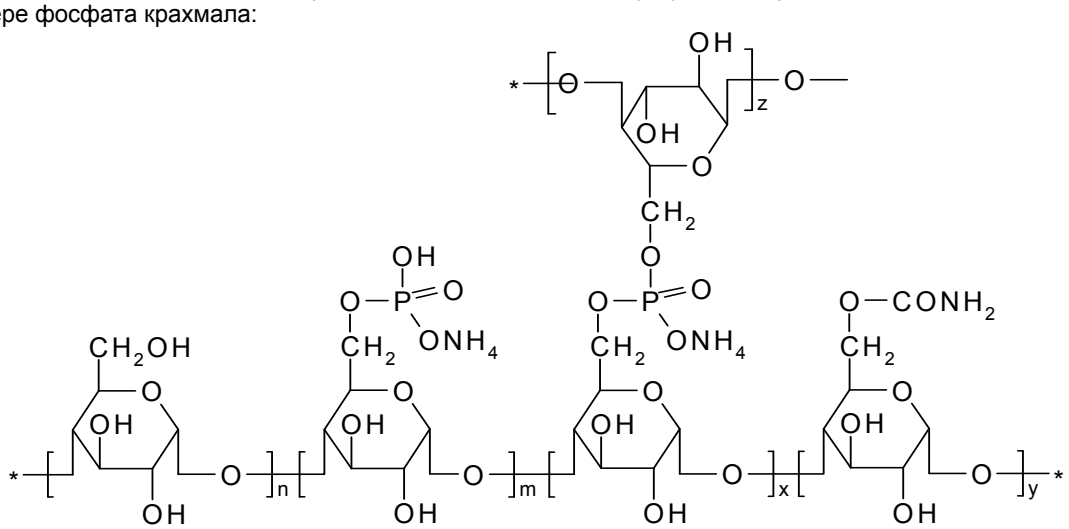
В последние три десятилетия проводятся интенсивные исследования полимерных систем для контролированного высвобождения биологически активных веществ в виде эмульсий, суспензий, микрокапсул, микросфер, наночастиц, липосом и т.д. К настоящему времени наиболее широко применяемыми носителями при создании таких систем являются биодеградируемые полимеры, например, полигалактин, поли-(изобутилцианоакрилат), поли(2-гидроксиэтил-L-глутамин, полимолочная кислота и др.

С целью поиска новых потенциальных носителей для пролонгированной доставки лекарственных веществ в данной работе осуществлен синтез и исследованы структура, основные физико-химические и медико-биологические характеристики фосфатов крахмала и декстрана.

Фосфаты крахмала и декстрана получали путем этерификации полисахаридов ортофосфорной кислотой в расплаве мочевины]. В качестве исходного материала использован картофельный крахмал (содержание амилозы со степенью полимеризации 1760 составляет 23,8 мас. %) и декстран с молекулярной массой 60, 500 и 1000 кДа.

Исследовано влияние соотношения компонентов в смеси ортофосфорная кислота-мочевина, температуры и давления в системе на степень замещения по фосфорнокислым ($СЗ_p$) и карбаматным($СЗ_N$) группам, выход продуктов реакции в виде гидрогелей. Структура полученных гелей, их кислотно-основные и реологические свойства, степень набухания изучены методами ИК-спектроскопии, потенциометрического титрования, вискозиметрии, элементного анализа, электронной микроскопии, гравиметрическим методом.

Методами ЯМР^{31}Р-спектроскопии и потенциометрического титрования установлено, что фосфаты полисахаридов представляют собой смесь двухосновных, одноосновных фосфатов, процентное содержание которых зависит от условий синтеза. Схема структуры продуктов реакции представлена на примере фосфата крахмала:



В работе получены гидрогели на основе фосфатов декстрана и крахмала со степенью замещения по фосфорнокислым и карбаматным группам 0,47 – 1,09 и 0,20 – 0,57, соответственно, и степенью набухания в интервале 3970 – 18820 %.

Фосфаты полисахаридов не проявляют токсических свойств и обладают собственной противоопухолевой активностью (оценка проведена на белых беспородных крысах с перевитыми саркомой М-1, Йенсена, гепатомой Зайделя). Гидрогели обладают пористой структурой, имеют высокую скорость набухания и сорбции биологически активных веществ.

Выявленные физико-химические и медико-биологические свойства фосфатов полисахаридов позволяют предположить перспективность дальнейшего изучения синтезированных эфиров полисахаридов в качестве носителей для контролированного высвобождения лекарственных веществ.

SYNTHESIS, PHYSICOCHEMICAL AND MEDICOBIOLOGICAL PROPERTIES OF PHOSPHATES POLYSACCHARIDES

Yurkshtovich T.L., Golub N.V., Yurkshtovich N.K., Alinovskaya V.A., Kosterova R.I., Bychkovsky P.M.

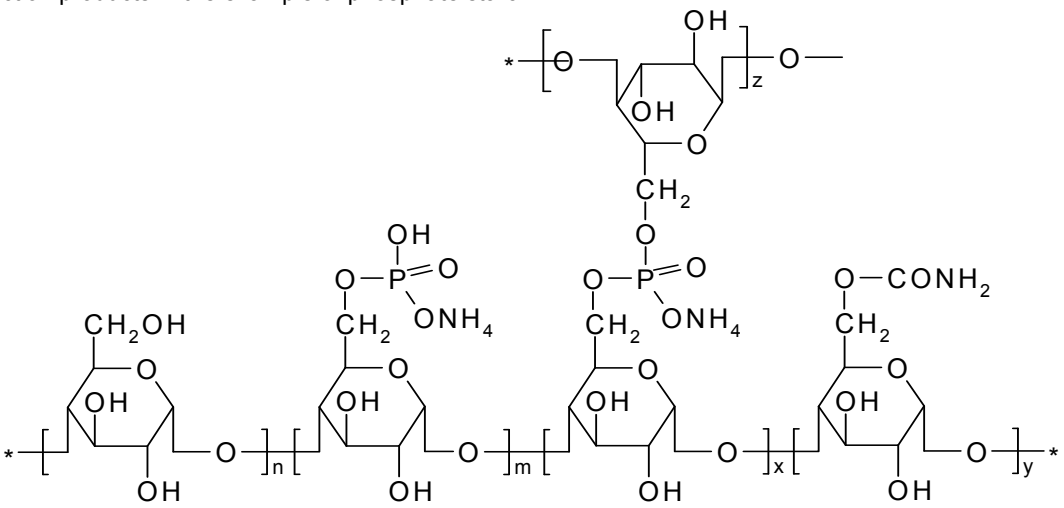
The establishment of the Belarusian State University, "Research Institute of Physico-Chemical Problems", Minsk, Belarus
e-mail: Natali Golub@tut.by

In the past three decades a polymer systems for controlled release of biologically active substances in the form of emulsions, suspensions, microcapsules, microspheres, nanoparticles, liposomes, etc are intensive studies. To date, materials for use in this systems are biodegradable polymers such as poligalactin, poly-(isobutylcyanoacrylate), poly (2-hydroxyethyl-L-glutamine, poly(lactic acid) and others.

With a view to the application in controlled drug delivery systems, phosphates of starch and dextran were synthesis. The object of research were used the potato starch (amylose content with the degree of polymerization of 1760 was 23.8 wt.%) and dextran with a molecular mass of 60, 500 and 1000 kDa.

In the present work the reaction of polysaccharides with phosphoric acid and urea studied in dependence on molar ratio of reagents and reaction conditions. The influence of the ratio of components in a mixture of phosphoric acid : urea, temperature and pressure on the degree of substitution of phosphate (CD_P) and carbamate (CD_N) groups, the yield of the reaction products in the form of hydrogels were investigated. The structure of the gels, their acidic and rheological properties, the degree of swelling were studied by infrared spectroscopy, NMR^{31}P spectroscopy, potentiometric titration, viscometry, electron microscopy, gravimetric method.

The phosphorylation of polysaccharides by phosphoric acid in molten urea yields a mixture of dibasic, monobasic phosphate, the percentages of which depend on the reaction conditions. Scheme of the structure of the reaction products in the example of phosphate starch:



A wide range of hydrogels were prepared (yield - more than 92%) with various degrees of substitution of phosphate groups and carbamate 0.47 - 1,09 and 0,20 - 0,57, respectively, and the degree of swelling in the interval 3970 – 18820 %. Hydrogels have microporous structure, the high rate of swelling and sorption of biomoleculs.

Phosphate dexstran and phosphate starch are a biologically compatible, non-toxic, biodegradable polymers, they inhibited growth of the experimentally-induced tumors in rats (sarcoma M1, Jensen sarcoma, ascites hepatoma Seidel). All the above-described features make such carriers promising for producing the new dosage forms.

СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫЙ КОМПЛЕКС МОНОАММОНИЙНОЙ СОЛИ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ГЛИЦИРАМА) С β-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

[1]Яковишин Л.А., [2]Гришковец В.И., [1]Белаш Д.Ю., [1]Яровой И.Р., [1]Корж Е.Н., [3]Копытов Ю.П.

[1]Севастопольский национальный технический университет, Севастополь, Украина
e-mail: chemsevntu@rambler.ru
[2]Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
[3]Филиал Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова в Севастополе, Севастополь, Украина

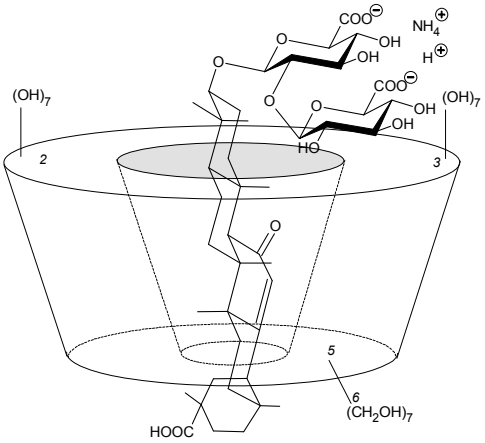
Сегодня комплексообразованию тритерпеновых сапонинов с биологически активными веществами уделяется много внимания, т.к. оно является одним из направлений для создания низкодозных лекарственных препаратов [1]. Молекулярное капсулирование лекарственных веществ наиболее подробно рассмотрено только для глицирризиновой кислоты, основного тритерпенового гликозида растений видов рода *Glycyrrhyza* [1, 2]. Синтезированы клатратные комплексы глицирризиновой кислоты с производными пиримидина, нестероидными противовоспалительными средствами, простагландинами, кардиоактивными и психотропными препаратами [2].

Моноаммонийную соль глицирризиновой кислоты (глицирам, **GC**) используют как противовоспалительное и антиаллергическое средство. Недавно получены молекулярные комплексы GC с сульфаниламидными препаратами, госсиполом, бычьим сывороточным альбумином, пиридином, ароматическими карбоновыми кислотами и алкалоидами. β-Циклодекстрин (**CD**) широко применяют для молекулярного капсулирования разнообразных веществ [3].

Нами получен молекулярный комплекс **GC** с **CD**. Состав комплекса определен методом изомолярных серий. При этом получено молярное отношение ≈ 0.98, что соответствует составу комплекса 1:1. При анализе УФ-спектров растворов, содержащих смесь **GC** с **CD**, максимум поглощения **GC** (258 нм) не изменяется при увеличении концентрации **CD**. Однако растворы **GC** с добавкой **CD** имеют меньшую оптическую плотность, т.е. наблюдается гипохромный эффект.

В ИК-спектре комплекса наблюдается сдвиг частоты поглощения группы COO^- молекулы **GC**. Отмечено смещение максимумов поглощения связей CO в группах C–O–C и C–OH как для **GC**, так и **β-CD**. Такие изменения можно объяснить образованием водородных связей с участием OH-групп у C-2 и C-3 глюкозных остатков **CD** и групп OH и COO^- углеводной цепи молекулы **GC**. При формировании комплекса изменяются частоты поглощения CH-связей. Наибольшее смещение отмечено для **CD**. Таким образом, комплекс образуется за счет водородных связей и гидрофобных взаимодействий.

Исследована ихтиотоксичность комплекса. Установлено, что индивидуальные **GC** и **CD**, а также их комплекс состава 1:1, не проявили токсического действия на рыб *Poecilia reticulata* при экспозиции в течение 24 ч.



Работа выполнена при поддержке Фонда социально-экономического развития г. Севастополя (2010, 2011 гг.).

Литература:

1. *Т.Г. Толстикова, А.Г. Толстиков, Г.А. Толстиков.* // На пути к низкодозным лекарствам - Вестник РАН, 2007, т. 77, N10, с. 867-874.
2. *Г.А. Толстиков, Л.А. Балтина, В.П. Гранкина, Р.М. Кондратенко, Т.Г. Толстикова.* Солодка: Биоразнообразие, химия, применение в медицине. Новосибирск: Гео, 2007, 311 с.
3. *J.W. Steed, J.L. Atwood.* Supramolecular chemistry. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2000, 745 p.

SUPRAMOLECULAR COMPLEX OF MONOAMMONIUM GLYCYRRHIZATE (GLYCYRRAM) WITH β-CYCLODEXTRIN

[1]Yakovishin L.A., [2]Grishkovets V.I., [1]Belash D.Yu., [1]Yarovoy I.R., [1]Korzh E.N., [3]Kopytov Yu.P.

[1]Sevastopol National Technical University, Sevastopol, Ukraine
e-mail: chemsevntu@rambler.ru
[2]V.I. Vernadsky Taurida National University,Simferopol, Ukraine
[3]Branch Campus in Sevastopol, M.V. Lomonosov Moscow State University,Sevastopol, Ukraine

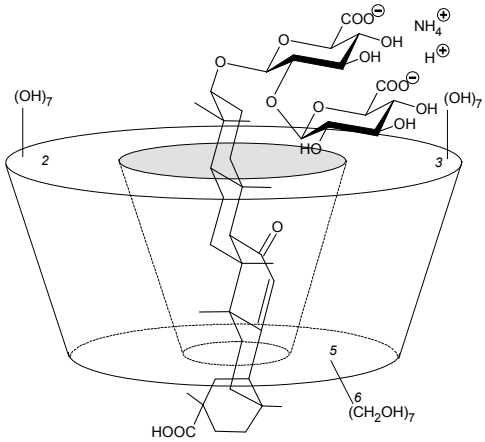
Today the complexation of triterpene saponins with biologically active compounds is of great interest because it represents a method for creating low-dose drugs [1]. Molecular encapsulation of drugs has been examined in most detail mainly only for glycyrrhizic acid, the main triterpene glycoside of plants of the genus *Glycyrrhiza* [1, 2]. Clathrate complexes of glycyrrhizic acid with pyrimidine derivatives, prostaglandins, nonsteroidal anti-inflammatory, cardio-active and psychotropic drugs were synthesized [2].

Monoammonium glycyrrhizate (glycyrram, **GC**) is used as anti-inflammatory and antiallergenic drug. Molecular complexes **GC** with sulfanilamides, gossypol, bovine serum albumin, pyridine, aromatic carboxylic acids, and alkaloids were recently prepared. β-Cyclodextrin (**CD**) is widely used for encapsulation of different compounds [3].

We prepared complex of **GC** with **CD**. The composition of the complex was determined by method of isomolar series. This method gave a molar ratio ≈0.98, which corresponded to a 1:1 **GC–CD** complex. At the analysis of UV spectra of the solutions containing a mixture of **GC** with **CD**, the absorption maximum **GC** (258 nm) does not change as the **CD** concentration increases. However, **GC** solutions with the addition of **CD** have a lower optical density (hypochromic effect).

The IR spectrum of the complex observed frequency shift of the absorption COO^- group of **GC**. The absorption maximums of the CO bonds in groups C–O–C and C–OH for **GC**, and **CD** were changed. Such changes can be attributed to the formation of hydrogen bonds involving OH groups at C-2 and C-3 glucose residues of **CD** and OH and the COO^- groups of carbohydrate chain **GC**. As forming the complex, the absorption frequencies of the CH bonds were changed. The largest shift was observed for **CD**. Thus, the complex formed by hydrogen bonds and hydrophobic interactions.

The ichtyotoxic activity of the complex was studied. The individual **GC** and **CD**, as well as their 1:1 complex, were showed no toxic effect on fish *Poecilia reticulata* during exposure for 24 h.



The work was supported by the Fund of Sevastopol Socio-Economic Development (2010, 2011).

Referensis:

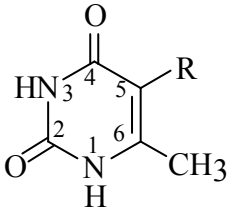
1. *T.G. Tolstikova, A.G. Tolstikov, G.A. Tolstikov.* // On the way to low-dose drugs - Vestn. Ross. Acad. Nauk, 2007, V. 77, N10, p. 867-874.
2. *G.A. Tolstikov, L.A. Baltina, V.P. Grankina, R.M. Kondratenko, T.G. Tolstikova.* Licorice: biodiversity, chemistry and application in medicine. Novosibirsk: Geo, 2007, 311p.
3. *J.W. Steed, J.L. Atwood.* Supramolecular chemistry. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2000, 745 p.

ИНГИБИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ 5-АМИНО-6-МЕТИЛУРАЦИЛА НА СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ 1,4-ДИОКСАНА

Якупова Л.Р, Сахаутдинова Р.А., Сафиуллин Р.Л.

Учреждение Российской академии наук Институт органической химии Уфимского научного центра РАН,
Уфа, Российская Федерация,
e-mail: jkupova@anrb.ru

Производные урацила применяют в качестве медицинских препаратов, так как они обладают широким спектром фармакологической активности. Ранее [1, 2] было показано, что 5-замещенные-6-метилурацилы в модельной системе инициированного радикально-цепного окисления проявили себя как ингибиторы. Возможно, это и является одной из причин их биологической активности. Вызывает интерес, какая функциональная группа в молекуле урацила ответственна за ингибирующий эффект. В литературе имеются данные об отрыве пероксидным радикалом атома водорода от атома N^1 аминного цикла, также предполагается, что пероксидный радикал атакует заместитель в 5 положении цикла либо присоединяется по двойной связи цикла [3]. В настоящей работе было проведено измерение константы скорости ингибирования (fk_7) для 5-амино-6-метилурацила (**АМУ**) и исследовано влияние на константу скорости ингибирования замены атомов водорода на метильные заместители в 1, 3 и 5 положениях цикла, то есть в местах предполагаемой атаки пероксидным радикалом.



АМУ

Измерение fk_7 проводили манометрическим методом в модельной системе радикально-цепного окисления 1,4-диоксана при температуре 333 К. За кинетикой процесса следили по поглощению кислорода с помощью универсальной манометрической установки, снабженной высокочувствительным дифференциальным датчиком давления.

Полученные константы скорости (fk_7) для исследованных соединений представлены в таблице. Анализ результатов позволяет предположить, что местом атаки пероксидным радикалом в **АМУ** является аминная группа.

Таблица. Зависимость константы скорости fk_7 от заместителей в АМУ. 333 К

Заместители в 5-амино-6-метилурациле	fk_7/л·(моль·с)$^{-1}$
N^1-**H**, N^3-**H**, C^5-**NH_2**	$(4.9\pm1.6)\cdot10^5$
N^1-**CH_3**, N^3-**CH_3**, C^5-**NH_2**	$(7.7\pm3.0)\cdot10^5$
N^1-**H**, N^3-**CH_3**, C^5-**NH_2**	$(7.1\pm2.9)\cdot10^5$
N^1-**H**, N^3-**H**, C^5-**$N(CH_3)_2$**	-

Литература:

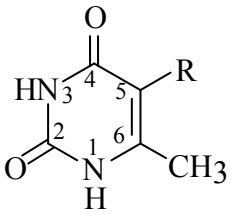
1. *Якупова Л.Р., Иванова А.В., Сафиуллин Р.Л., Гимадиева А.Р., Чернышенко Ю.Н., Мустафин А.Г., Абдрахманов И.Б.* // Ингибирующее влияние производных 6-метилурацила на свободно-радикальное окисление 1,4-диоксана – Изв. АН, сер. хим, 2010, №3, с. 507-511
2. *Герчиков А.Я., Гарифуллина Г.Г., Сафарова И.В., Абдрахманов И.Б., Мустафин А.Г., Кривоногов В.П.* // Анормальное влияние пероксида водорода на ингибированное добавками урацилов окисление изопропанола - Доклады АН, 2004, т. 394, №2, с. 215-217
3. *Даутова И.Ф., Ахатова Г.Р., Сафарова И.В., Герчиков А.Я., Хурсан С.Л.* // Взаимодействие пероксильных радикалов с урацилами в акте ингибирования окисления изопропидового спирта - Доклады АН, 2010, т. 431, №4, с. 487-489

INHIBITING EFFECT OF 5-AMINO-6-METHYLURACIL ON THE FREE-RADICAL OXIDATION OF 1,4-DIOXANE

Yakupova L.R., Sahautdinova R.A., Safiullin R.L.

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

Uracil derivatives are used in medicines as drugs with a wide range of pharmacological activity associated, in particular, with the antiradical properties of these compounds. Earlier [1, 2] it has been shown that 5-substituted 6-methylurasils in the model system of initiated radical-chain oxidation have proved as inhibitors. Probably it also is one of the reasons of their biological activity. The interest, what functional group in 6-methylurasil is responsible for effect of inhibition. Probably the peroxide radical attacks the hydrogen atom of N^1-H bond. Also it is supposed that the peroxide radical attacks the substituent in position 5 or joins on double bond of the 6-methylurasil cycle [3].



AMU

In the present work the rate constants (fk_7) of the reaction of 1,4-dioxane peroxide radicals with 5-amino-6-methyluracil (**AMU**) were measured. We investigated, as replacement of hydrogen atoms on methyl substituents in positions 1, 3 and 5 of the uracil cycle will affect efficiency of inhibition. The oxidation rate measured using a manometric differential setup at 333 K.

The obtained rate constants (fk_7) are listed in Table. The analysis of results allows to assume that the peroxide radical attacks NH_2-group of **AMU**.

Table. Rate constants for reaction of the 1,4-dioxane peroxide radicals with 5-amino-6-methyluracil. 333 K

substituents in 5-amino-6-methyluracil	fk_7/л·(моль·с)$^{-1}$
N^1-**H**, N^3-**H**, C^5-**NH_2**	$(4.9\pm1.6)\cdot10^5$
N^1-**CH_3**, N^3-**CH_3**, C^5-**NH_2**	$(7.7\pm3.0)\cdot10^5$
N^1-**H**, N^3-**CH_3**, C^5-**NH_2**	$(7.1\pm2.9)\cdot10^5$
N^1-**H**, N^3-**H**, C^5-**$N(CH_3)_2$**	-

References:.

1. *Yakupova L.R., Ivanova A.V., Safiullin R.L., Gimadieva A.R., Chernyshenko Yu.N., Mustafin A.G., Abdrakhmanov I.B.* // Inhibiting effect of 6methyluracil derivatives on the freeradical oxidation of 1,4dioxane - Russian Chemical Bulletin, 2010, v. 59, N3, p. 517-521
2. *Gerchikov A. Ya., Garifullina G. G., Safarova I. V., Abdrakhmanov I. B., Mustafin A. G., Krivonogov V. P.* // Anomalous Effect of Hydrogen Peroxide on 2-Propanol Oxidation Inhibited by Uracil Additives - Dokl.Akad. Nauk, 2004, v. 394, p. 215-217 [Dokl. Chem. (Engl. Transl.), 2004].
3. *Dautova I.F., Akhatova G.R., Safarova I. V., Gerchikov A. Ya., Khursan S.L.* // Reaction of Peroxyl Radicals with Uracils in the Event of Inhibition of Isopropyl Alcohol Oxidation - Dokl.Akad. Nauk, 2010, v. 431, p. 487-489 [Dokl. Chem. (Engl. Transl.), 2010].

NOVEL PHARMACOGNOSTIC CHARACTERIZATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Venkat Rao

CSC Defense Group/National and Defense Programs, Alexandria, Virginia, USA
e-mail: vrao4@csc.com

Biologically active agents from natural sources have been a source of inspiration for development of novel therapeutic agents and other applications in veterinary and agricultural sciences. Considerable problem exists with chemical and biological standardization centered on conventional procedures used for identification and characterization of active biological components from natural sources, and a combination of conventional wet chemistry techniques and spectroscopy, together with preliminary evaluation of biological potency using experimental animal models or microbiological screening systems. However, with the availability of more advanced identification and characterization of the biological source using chemotaxonomy and genetic fingerprinting techniques, chemical and biological standardization is much more reliable and reproducible.

Elucidation of the chemical structural features of novel secondary metabolites sets the basic tenant for design and exploitation of novel medicinal chemistry designs. Much of the current interest in medicinal chemistry stems from the fact that natural products offer immense scope for exploring chemical space for novel structures and opportunity to probe SAR relationships for development of hitherto unknown synthetic pathways. Given that the diversity within the synthetic organic chemistry have inherent limitations, scientists are exploring novel approaches using computational techniques to predict novel structures and approaches to design based on foundational structural moieties of chemical entities from natural sources.

This paper will provide a current state-of-the-art review and analysis of emerging genomic, chemotaxonomic and computational techniques in characterization of biologically active substances, and research underway in the exploration of chemical space for novel chemical structural designs of based on secondary metabolites of biological origin. Presentation will outline our experience in the use of SAR methods in predictive toxicology of biological active compounds from synthetic and natural sources for such endpoints as carcinogenesis, co-carcinogenesis, promotion and/or inhibition of cancer and reproductive effects.

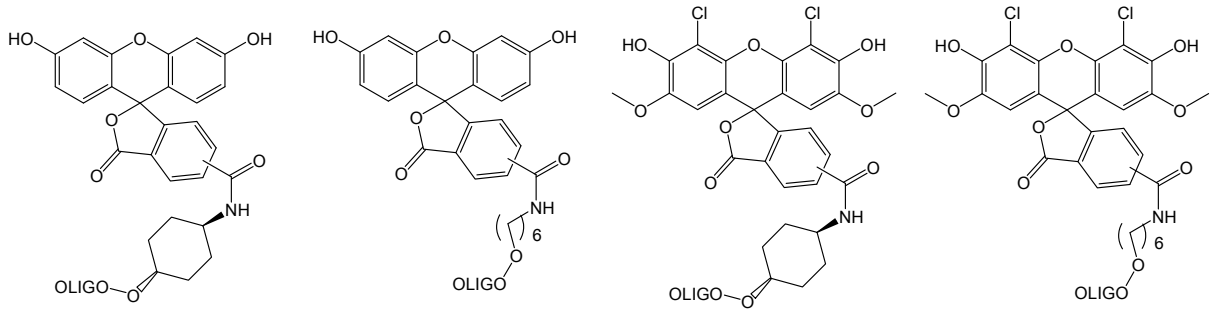
ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ЛИНКЕРНОЙ ГРУППЫ НА СВОЙСТВА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Цыбульский Д.А., Квач М.В., Шманай В.В.

Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: tsybulski@yandex.ru

Модифицированные флуоресцентными красителями олигонуклеотиды широко применяются в качестве ДНК-зондов при проведении полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени. Введение в олигонуклеотид какой-либо модифицирующей группы в большей или меньшей степени оказывает влияние на свойства полученного конъюгата.

Мы исследовали влияние структуры линкерной группы на фотофизические и спектроскопические свойства флуоресцентно меченых олигонуклеотидов. В качестве линкерных групп выбраны 6-аминогексанол и 4-транс-аминоциклогексанол. Более гибкий 6-аминогексанол позволяет флуорофору свободно вращаться вокруг 5´-конца олигонуклеотида, тогда как 4-транс-аминоциклогексанол представляет собой жесткую структуру, существенно ограничивающую степени свободы флуорофора. В качестве флуорофоров исследованы два ксантеновых красителя 5(и 6)-карбоксифлуоресцеины (FAM) (**1**,**2**) и 4´,5´-дихлор-2´,7´-диметокси-5(и 6)-карбоксифлуоресцеины (JOE) (**3**,**4**).



1 **2** **3** **4**

Известно, что гуаниновые основания способствуют тушению флуоресценции находящегося вблизи них красителя. Причем, чем больше гуаниновых остатков, тем меньше квантовый выход флуоресценции красителя.

Мы установили, что в случае более гибкого 6-аминогексанола снижение квантового выхода флуоресценции существенно больше, нежели в случае жесткой линкерной группы. Наряду с этим, квантовый выход флуоресценции красителя в модифицированных олигонулеотидах в составе дуплексов, содержащих в качестве линкерной группы 6-аминогексанол и непосредственно связанных с гуаниновыми основаниями, также снижен, как и в модифицированном олигонуклеотиде. Но в случае 4-транс-аминоциклогексанола наблюдался обратный эффект: в сравнении с модифицированным олигонуклеотидом, в соответсвующем дуплексе квантовый выход увеличивался в 2-10 раз, нивелируя действие гуанинового основания.

Таким образом, было показано влияние структуры линкерной группы на квантовый выход флуоресценции красителя в составе модифицированного олигонуклеотида и в дуплексах. Обнаружен эффект увеличения квантового выхода флуоресценции красителя в составе дуплекса с жесткой линкерной группой.

Фундаментальные и прикладные аспекты получения биологически активных веществ: природные соединения

Fundamental and Applied Problems of Obtaining of Bioactive Substances: Natural compounds

Спонсор Конференции

BIO-RAD

BIO-RAD Laboratories

Обладнання і реагенти для дослідницьких, медичних та промислових лабораторій

Компанія BIO-RAD (США) є найбільшим світовим виробником лабораторного та аналітичного обладнання. На сьогодні BIO-RAD представляє широку гамму обладнання для дослідницьких та промислових лабораторій:

- **ПЛР-ампліфікатори CFX96 Real Time**
- **Обладнання та реагенти для геном них та протеомних досліджень**
- **Обладнання для рідинної хроматографії**
- **Обладнання, реагенти і витратні матеріали для електрофорезу та блоттінгу**
- **Системи анализу зображення. Документуючі системи. Програмне забеспечення**

За додатковою інформацією щодо технічних можливостей та вартості продукції компанії BIO-RAD просимо Вас звертатися до регіонального представництва компанії в Україні за адресою:

Київ, 02160, проспект Возз'єднання 7а, оф. 315
Тел.: (050) 446-21-13, (050) 448-34-56
e-mail: office@bio-rad.com.ua
www.bio-rad.com

КОНДЕНСИРОВАННЫЕ ТАНИНЫ РАСТЕНИЙ РОДА *EUPHORBIA*

Абдулладжанова Н.Г., Мавлянов С.М., Салихов Ш.И., Камаев Ф.Г.

Институт биоорганической химии АН РУз, Ташкент, Узбекистан
e-mail: anodira73@rambler.ru

Наше внимание привлекли растения сем. Euphorbiaceae, произрастающих на территории Узбекистана, которые богаты полифенольными веществами В данной работе мы представляем новые, ранее не описанные в литературе соединения.

(-)-эпикатехингаллат-7-О-(-β-D-Glcp)-(4β→8)-галлокатехин-(4β→8)–(+)- катехин - (4β→8) – (-) – эпигаллокатехин -3-О-галлат - выделен из Euphorbia sequieriana Neck. $C_{74}H_{66}O_{37}$, $[\alpha]_D$+56.2^0 (с 1.0, ацетон-вода 1:1). УБ-спектр (МеОН, λ_{max}, нм): 220, 280; ^{13}С-ЯМР-(50 МГц, ацетон–d_6 +D_2O, м.д.): 75.2 (С-2, верх. блок), 74.5 (С-3), 34.0 (С-4), 84.0 (С-2, нижн. блок)- кольцо- С; 95.6, 97.5 (С-6, С-8, верх. блок,), 156.4, 157.0 (С-5, 7, 9), 107.0 (С-8, нижн. блок), 103.0, 101.0 (С-10)- кольцо-А; 114.5, 119.1 (С-2`, С-6`), 131.0, 133.1 (С-1`), 144.8 (С-4`), 144.8 (С-3`, С-5`)- кольцо-В; 165.6 (-СОО-); 119.7 (С-1), 110.1 (С-2, 6), 146.0 (С-3, 5), 139.0 (С-4)- галлоильная гр.; 93.5, 72.1, 73.6, 69.4, 73.8, 62.8 –глюкоза.

(-)-эпикатехингаллат-7-О-(-β-D-Glcp)-(4β→8)-[(-)–эпигаллокатехингаллат]$_2$ – выделен из E.glomerulana Prokh. $C_{72}H_{61}O_{36}$, ЯМР-(50 МГц, ацетон–d_6 +D_2O, м.д.): 77.6, 73.5, 36,7 (С-2, С-3, С-4, верх. блок), 77.6 (С-2, нижн. блок)- кольцо- С; 95.3, 95.6 (С-6, С-8, верх. блок), 157-158 (С-5, 7, 9), 106.6 (С-8, нижн. блок), 102.0, 99.9 (С-10)- кольцо-А; 115.0, 109.1 (С-2`), 131.0 (С-1`), 144.9, 134.8 (С-4`), 144.7, 1449.9 (С-3`, С-5`), 115.3 (С-5`), 109.1 (С-6`)- кольцо-В; 167.0 (-СОО-); 119.0 (С-1), 110.1 (С-2, 6), 146.0 (С-3, 5), 139.0 (С-4)- галлоильная гр.; 99.4, 73.0, 76.2, 69.9, 73.9, 63.3 –глюкоза.

(-)-эпикатехин-7-О-(β-D-Glcp)-(4β→8)-(±)-галлокатехин-(4β→8)-(+)-катехин-(4β→8)-(±) - галлокатехин-7-О-(β-D-Glcp) – выделен из E.densa Bull. Rgl., $C_{72}H_{70}O_{35}$, $[\alpha]_D$+86.2^0 (с 1.0, ацетон-вода 1:1). УФ-спектр (МеОН, λ_{max}, нм): 224, 282. ЯМР-(50 МГц, ацетон–d_6 +D_2O, м.д.): 76.7, 72.9, 36,9 (С-2, С-3, С-4, верх. блок), 83.0, 81.9 (С-2, нижн. блок)- кольцо- С; 96.9 (С-6, С-8, верх. блок), 153-158 (С-5, 7, 9), 107.0, 109.0 (С-8, нижн. блок), 102.4 (С-10)- кольцо-А; 114.6, 115.5 (С-2`, С-5`), 130.9 (С-1`), 144.5 (С-3`, С-4`), 119.3 (С-6`)- кольцо-В; 95.3, 78.8, 77.6, 70.9, 72.7, 64.4 –глюкоза.

(±)-галлокатехин-7-О-(β-D-Glcp)-(4β→8)-(±)-галлокатехин-(4β→8)-(-)-эпигаллокатехин-галлат-5-О-(β-D-Glcp) – выделен из E.jaxartica Prokh., $C_{64}H_{62}O_{34}$, Тпл. 245-247^{0}С (с разлож.). ЯМР-(50 МГц, ацетон–d_6 +D_2O, м.д.): 83.8, 72.5, 37,5 (С-2, С-3, С-4, верх. блок), 77.2, 78.6 (С-2, нижн. блок)- кольцо- С; 95-97 (С-6, С-8, верх. блок), 156-157 (С-5, 7, 9), 106-107 (С-8, нижн. блок), 101.9, 102.5 (С-10)- кольцо-А; 108- 115 (С-2`), 131.5 (С-1`), 146.0 (С-3`, С-5`), 133.0 (С-5`), 108.1 (С-6`), 115.9, 145.3 (С-5`, С-4` нижн.блок)- кольцо-В; 121.1 (С-1), 109-110 (С-2, 6), 145.5 (С-3, 5), 139.2 (С-4)- галлоильная гр; 163.0 (-СОО-); 91.0, 73.6, 75.9, 68.9, 71.3, 63.1 –глюкоза.

(+)-катехин)-(4 β→8) -(±)-галлокатехин-(4β→8)- (-)-эпикатехин-5-О-(β-D-Glcp) - выделен из E.talastavica Prokh., $C_{51}H_{48}O_{24}$, ЯМР-(50 МГц, ацетон–d_6 +D_2O, м.д.): 83.7, 73.9, 38,3 (С-2, С-3, С-4, верх. блок), 81.9, 76.7 (С-2, нижн. блок)- кольцо- С; 96.9 (С-6, С-8, верх. блок), 155-158 (С-5, 7, 9), 107.4, 106.9 (С-8, нижн. блок), 101-102 (С-10)- кольцо-А; 115.9 (С-2`, С-5`верх.блок), 131.9 (С-1`), 145.9 (С-3`, С-4`), 120.3 (С-6` верх.блок), 108.9, 133.7, 146.2 (С2`, С-4`, С-5` нижн.блок)- кольцо-В; 94.9, 78.3, 75.7, 68.9, 70.7, 63.6 –глюкоза.

(-)-эпигаллокатехингаллат-(4β→8)-(+)-катехин-(4β→8)-(-)-эпикатехингаллат-(4β→8)-(±)–галло-катехин – выделен из E.turkestanica Rgl., $C_{74}H_{58}O_{32}$, ЯМР-(50 МГц, ацетон–d_6 +D_2O, м.д.): 76.49, 75.4, 36.7 (С-2, С-3, С-4 верх. блок), 82.6, 74.5, 83.5 (С-2, нижн. блок)- кольцо- С; 95.6, 96.7 (С-6, С-8, верх. блок), 153-158 (С-5, 7, 9), 107.9, 106.2, 103.4 (С-8, нижн. блок), 101-103 (С-10)- кольцо-А; 114.5 (С-2` верх.блок), 131.1 (С-1`), 144.8 (С-3`, С-4`), 144-145 (С-5`), 199-120 (С-6`) - кольцо-В; 120.1 (С-1), 109.9 (С-2, 6), 145.4 (С-3, 5), 138.9 (С-4)- галлоильная гр; 166.2, 166.5 (-СОО-)

Выделенные соединения переданы в НИИ Вирусологии МЗ РУз, Республиканский Паталого-анатомический Центр МЗ РУз. Институт Кардиологии МЗ РУз, Институт Онкологии и Радиологии МЗ РУз и др. для скрининга их биологической активности. Выявлено, что данные вещества обладают выраженным противовирусным, интерфероиндуцирующим, антигипоксическим, противоопухолевым действием и они рекомендованы для углубленного фармакологического изучения.

CONDENSED TANNINS FROM *EUPHORBIA* PLANT *SPECIES*

Abdulladjanova N.G., Mavlyanov S.M., Salikhov Sh.I., Kamaev F.G.

Institute of bioorganic chemistry Academy of Sciences Republic of Uzbekistan, Tashkent, Uzbekistan
e-mail: anodira73@rambler.ru

Our attention was involved to the plants of family Euphorbiaceae, growing in the territory of Uzbekistan which are rich to polyphenolic substances. In this work we represent new compounds which are earlier not described in the literature.

(-)-epicatechin gallate-7-O-(-β-D-Glcp)-(4β→8)-gallocatechin-(4β→8)–(+)- catechin - (4β→8) – (-) – epigallocatechin -3-O-gallate – isolated from Euphorbia sequieriana Neck. $C_{74}H_{66}O_{37}$, $[\alpha]_D$+56.2^0 (c 1.0, acetone-water 1:1). UV-(λ_{max}, MeOH, nm): 220, 280; ^{13}C-NMR-(50 MHz, Me_2CO–d_6 +D_2O, ppm) δ: 75.2 (C-2, extension unit), 74.5 (C-3), 34.0 (C-4), 84.0 (C-2, terminal unit)- ring C; 95.6, 97.5 (C-6, C-8, extension unit), 156.4, 157.0 (C-5, 7, 9), 107.0 (C-8, terminal unit), 103.0, 101.0 (C-10)- ring A; 114.5, 119.1 (C-2`, C-6`), 131.0, 133.1 (C-1`), 144.8 (C-4`), 144.8 (C-3`, C-5`)- ring B; 165.6 (-COO-); 119.7 (C-1), 110.1 (C-2, 6), 146.0 (C-3, 5), 139.0 (C-4)- galloyl group; 93.5, 72.1, 73.6, 69.4, 73.8, 62.8 – glucose core.

(-)-epicatechin gallate-7-O-(-β-D-Glcp)-(4β→8)-[(-)-epigallocatechin 3-O- gallate]$_2$ – isolated from E.glomerulana Prokh. $C_{72}H_{61}O_{36}$, ^{13}C-NMR-(50 MHz, Me_2CO–d_6 +D_2O, ppm) δ: 77.6, 73.5, 36,7 (C-2, C-3, C-4, extension unit), 77.6 (C-2, terminal unit)- ring C; 95.3, 95.6 (C-6, C-8, extension unit), 157-158 (C-5, 7, 9), 106.6 (C-8, terminal unit), 102.0, 99.9 (C-10)-ring A; 115.0, 109.1 (C-2`), 131.0 (C-1`), 144.9, 134.8 (C-4`), 144.7, 1449.9 (C-3`, C-5`), 115.3 (C-5`), 109.1 (C-6`)- ring B; 167.0 (-COO-); 119.0 (C-1), 110.1 (C-2, 6), 146.0 (C-3, 5), 139.0 (C-4)- galloyl group; 99.4, 73.0, 76.2, 69.9, 73.9, 63.3 – glucose core.

(-)-epicatechin-7-O-(β-D-Glcp)-(4β→8)-(±)-gallocatechin-(4β→8)-(+)-catechin-(4β→8)-(±) - gallocatechin-7-O-(β-D-Glcp) – isolated from E.densa Bull. Rgl., $C_{72}H_{70}O_{35}$, $[\alpha]_D$+86.2^0 (c 1.0, acetone-water 1:1). UV-(λ_{max}, MeOH, nm): 224, 282. ^{13}C-NMR-(50 MHz, Me_2CO–d_6 +D_2O, ppm) δ: 76.7, 72.9, 36,9 (C-2, C-3, C-4, extension unit), 83.0, 81.9 (C-2, terminal unit)- ring C; 96.9 (C-6, C-8, extension unit), 153-158 (C-5, 7, 9), 107.0, 109.0 (C-8, terminal unit), 102.4 (C-10)- ring A; 114.6, 115.5 (C-2`, C-5`), 130.9 (C-1`), 144.5 (C-3`, C-4`), 119.3 (C-6`)- ring B; 95.3, 78.8, 77.6, 70.9, 72.7, 64.4 – glucose core.

(±)-gallocatechin-7-O-(β-D-Glcp)-(4β→8)-(±)-gallocatechin-(4β→8)-(-)-epigallocatechin gallate-5-O-(β-D-Glcp) – isolated from E.jaxartica Prokh., $C_{64}H_{62}O_{34}$, Тпл. 245-247^{0}C (с разлож.). ^{13}C-NMR-(50 MHz, Me_2CO–d_6 +D_2O, ppm) δ: 83.8, 72.5, 37,5 (C-2, C-3, C-4, extension unit), 77.2, 78.6 (C-2, terminal unit)- ring C; 95-97 (C-6, C-8, extension unit), 156-157 (C-5, 7, 9), 106-107 (C-8, terminal unit), 101.9, 102.5 (C-10)- ring A; 108- 115 (C-2`), 131.5 (C-1`), 146.0 (C-3`, C-5`), 133.0 (C-5`), 108.1 (C-6`), 115.9, 145.3 (C-5`, C-4` terminal unit)- ring B; 121.1 (C-1), 109-110 (C-2, 6), 145.5 (C-3, 5), 139.2 (C-4)- galloyl group; 163.0 (-COO-); 91.0, 73.6, 75.9, 68.9, 71.3, 63.1 – glucose core.

(+)-catechin-(4 β→8) -(±)-gallocatechin-(4β→8)- (-)-epicatechin-5-O-(β-D-Glcp) – isolated from E.talastavica Prokh., $C_{51}H_{48}O_{24}$, ^{13}C-NMR-(50 MHz, Me_2CO–d_6 +D_2O, ppm) δ: 83.7, 73.9, 38,3 (C-2, C-3, C-4, extension unit), 81.9, 76.7 (C-2, terminal unit)- ring C; 96.9 (C-6, C-8, extension unit), 155-158 (C-5, 7, 9), 107.4, 106.9 (C-8, terminal unit), 101-102 (C-10)- ring A; 115.9 (C-2`, C-5` extension unit), 131.9 (C-1`), 145.9 (C-3`, C-4`), 120.3 (C-6` extension unit), 108.9, 133.7, 146.2 (C2`, C-4`, C-5` terminal unit)- ring B; 94.9, 78.3, 75.7, 68.9, 70.7, 63.6 – glucose core.

(-)-epigallocatechin gallate-(4β→8)-(+)-catechin-(4β→8)-(-)-epicatechin gallate-(4β→8)-(±)–gallocatechin – isolated from E.turkestanica Rgl., $C_{74}H_{58}O_{32}$, ^{13}C-NMR-(50 MHz, Me_2CO–d_6 +D_2O, ppm) δ: 76.49, 75.4, 36.7 (C-2, C-3, C-4 extension unit), 82.6, 74.5, 83.5 (C-2, terminal unit)- ring C; 95.6, 96.7 (C-6, C-8, extension unit), 153-158 (C-5, 7, 9), 107.9, 106.2, 103.4 (C-8, terminal unit), 101-103 (C-10)- ring A; 114.5 (C-2` extension unit), 131.1 (C-1`), 144.8 (C-3`, C-4`), 144-145 (C-5`), 199-120 (C-6`) – ring B; 120.1 (C-1), 109.9 (C-2, 6), 145.4 (C-3, 5), 138.9 (C-4)- galloyl group; 166.2, 166.5 (-COO-)

Isolated compounds are transferred to the Institute of Virology, Republican Patalogo-anatomical Centre, Institute of Cardiology, Oncology and Radiology for screening of their biological activity. It is revealed, that the given compounds have antiviral, interferon inducing, antihypoxic, anticancer actions and they were recommended for deep pharmacological studying.

ГИДРОЛИЗУЕМЫЕ ТАННИНЫ РАСТЕНИЙ РОДА *EUPHORBIA*

Абдулладжанова Н.Г., Мавлянов С.М., Салихов Ш.И., Камаев Ф.Г.

Институт биоорганической химии АН РУз, Ташкент, Узбекистан
e-mail: anodira73@rambler.ru

Из исследованных видов растений рода Euphorbia (молочай) было выделено более 70 фенольных соединений и установлено их химическое строение. В процессе изучения фенольных соединений рода Euphorbia установлено, что ряд из них являются новыми, ранее не описанными в литературе веществами. С помощью физико-химических и спектральных данных установлены структуры этих соединений.

3-О-галлоил-1,2-валонеил-β-D-глюкоза - выделена из E.helioscopus L. $C_{34}H_{26}O_{23}$, Тпл. 215-217^{0}C, $[\alpha]_D$ +33^0 (c=0.5, MeOH), ^{13}C-ЯМР-(50 МГц, ацетон –d_6 +D_2O, м.д.): 92.34 (C-1), 75.38 (C-2), 78.0 (C-3), 70.6 (C-4), 72.6 (C-5), 63.6 (C-6)-глюкоза; 120.6 (C-1), 109.6 (C-2), 144.8 (C-3), 139.4 (C-4), 145.3 (C-5), 109.9 (C-6), 166.2 (C-7)-галлоильная гр.; 114.4 (C-1), 126.5 (C-2), 102.6 (C-3), 144.9 (C-4), 136.1 (C-5), 144.5 (C-6), 169.5 (C-7), 116.6 (C-1`), 126.0 (C-2`), 113.0 (C-3`), 146.7 (C-4`), 135.3 (C-5`), 145.0 (C-6`), 168.3 (C-7`), 111.5 (C-1``), 135.5 (C-2``), 140.6 (C-3``), 139.9 (C-4``), 143.0 (C-5``), 110.2 (C-6``), 164.1 (C-7``)-валонеильная гр.

2-О-галлоил-4,6-валонеил-β-D-глюкоза - выделена из E.turkestanica Rgl., $C_{41}H_{29}O_{27}$, $[\alpha]^{20}_D$ -28^0 (c=0.5, MeOH), Тпл. 228-230°C. ^{13}C-ЯМР-(50 МГц, ацетон –d_6 +D_2O, м.д.): 92.3 (C-1), 76.7 (C-2), 76.9 (C-3), 69.6 (C-4), 73.3 (C-5), 63.3 (C-6)-глюкоза; 119.8 (C-1), 109.4 (C-2), 146.0 (C-3), 139.9 (C-4), 146.0 (C-5), 110.5 (C-6), 165.4 (C-7)-галлоильная гр.; 115.9 (C-1), 126.1 (C-2), 107.7 (C-3), 145.2 (C-4), 136.7 (C-5), 144.7 (C-6), 167.6 (C-7), 117.8 (C-1`), 126.1 (C-2`), 106.1 (C-3`), 146.8 (C-4`), 137.4 (C-5`), 144.7 (C-6`), 167.8 (C-7`), 115.3 (C-1``), 137.5 (C-2``), 140.4 (C-3``), 139.8 (C-4``), 143.3 (C-5``), 110.1 (C-6``), 167.8 (C-7``)-валонеильная гр.

1,2-ди-О-галлоил-4,6-валонеил-β-D-глюкоза - выделена из E.jaxartica Prokh., $C_{41}H_{29}O_{27}$, Тпл. 240-242 (с разлож.). ^{13}C-ЯМР-(50 МГц, ацетон –d_6 +D_2O, м.д.): 95.3 (C-1), 76.5 (C-2), 76.9 (C-3), 69.4 (C-4), 73.2 (C-5), 63.2 (C-6)-глюкоза; 119.4 (C-1), 110.0 (C-2), 145.7 (C-3), 139.4 (C-4), 146.0 (C-5), 110.2 (C-6), 162.8 (C-7)-галлоильная гр.; 116.0 (C-1), 125.7 (C-2), 106.0 (C-3), 146.8 (C-4), 137.3 (C-5), 144.8 (C-6), 168.5 (C-7), 117.8 (C-1`), 126.1 (C-2`), 106.1 (C-3`), 146.8 (C-4`), 137.4 (C-5`), 144.7 (C-6`), 169.3 (C-7`), 114.3 (C-1``), 137.6 (C-2``), 140.2 (C-3``), 140.0 (C-4``), 142.7 (C-5``), 110.5 (C-6``), 167.0 (C-7``)-валонеильная гр.

1,2-ди-О-галлоил-3,6-валонеил-β-D-глюкоза – выделена из E.triodonta Prokh. $C_{41}H_{29}O_{27}$, ^{13}C-ЯМР-(50 МГц, ацетон –d_6 +D_2O, м.д.): 96.5 (C-1), 76.7 (C-2), 76.9 (C-3), 69.6 (C-4), 73.3 (C-5), 63.4 (C-6)-глюкоза; 120.0 (C-1), 110.1 (C-2), 145.3 (C-3), 146.0 (C-4), 145.8 (C-5), 110.2 (C-6), 165.6 (C-7)-галлоильная гр.; 114.2 (C-1), 125.1 (C-2), 107.5 (C-3), 145.8 (C-4), 136.6 (C-5), 145.2 (C-6), 167.4 (C-7), 122.1 (C-1`), 132.8 (C-2`), 111.2 (C-3`), 151.7 (C-4`), 135.7 (C-5`), 148.6 (C-6`), 167.0 (C-7`), 111.7 (C-1``), 141.3 (C-2``), 137.1 (C-3``), 143.4 (C-4``), 143.8 (C-5``), 109.9 (C-6``), 163.0 (C-7``)-валонеильная гр.

1-О-бисгаллоил-2,4-валонеил-β-D-глюкоза выделена из E. Kudrjaschevii Pazij., $C_{41}H_{30}O_{27}$, ^{13}C-ЯМР-(50 МГц, ацетон –d_6 +D_2O, м.д.): 92.2 (C-1), 75.1 (C-2), 78.5 (C-3), 66.8 (C-4), 73.9 (C-5), 63.3 (C-6)-глюкоза; 119.8 (C-1), 108.4 (C-2), 146.0 (C-3), 139.6 (C-4), 145.0 (C-5), 112.2 (C-6), 166.8 (C-7)-галлоильная гр.; 114.3 (C-1), 126.5 (C-2), 106.8 (C-3), 145.1 (C-4), 136.1 (C-5), 144.5 (C-6), 169.5 (C-7), 116.8 (C-1`), 126.0 (C-2`), 102.5 (C-3`), 146.8 (C-4`), 135.6 (C-5`), 145.0 (C-6`), 168.2 (C-7`), 111.4 (C-1``), 135.6 (C-2``), 140.6 (C-3``), 140.2 (C-4``), 143.3 (C-5``), 110.0 (C-6``), 164.2 (C-7``)-валонеильная гр.

1-О-галлоил-2,4-валонеил-3,6-гексагидроксидифеноил-β-D-глюкоза - выделена из E. rosularus (A.Teod), $C_{48}H_{32}O_{31}$, ^{13}C-ЯМР-(50 МГц, ацетон –d_6 +D_2O, м.д.): 92.5 (C-1), 74.2 (C-2), 75.2 (C-3), 70.8 (C-4), 73.1 (C-5), 63.2 (C-6)-глюкоза; 120.4 (C-1), 110.2 (C-2), 145.8 (C-3), 139.1 (C-4), 145.8 (C-5), 110.2 (C-6), 165.3 (C-7)-галлоильная гр.; 114.2 (C-1), 126.5 (C-2), 106.9 (C-3), 145.1 (C-4), 135.7 (C-5), 144.4 (C-6), 168.2 (C-7), 122.0 (C-1`), 132.2 (C-2`), 111.1 (C-3`), 151.6 (C-4`), 135.6 (C-5`), 148.7 (C-6`), 168.3 (C-7`), 113.1 (C-1``), 141.1 (C-2``), 137.1 (C-3``), 143.4 (C-4``), 143.7 (C-5``), 110.5 (C-6``), 163.1 (C-7``)-валонеильная гр.

Выделенные соединения переданы в «Институт иммунологии медико-биологического агенства» РФ, НИИ Вирусологии МЗ РУз, Республиканский Паталого-анатомический Центр МЗ РУз на исследование их биологической, в частности, противовирусной активности с целью выявления структурно-функциональной зависимости. Полученные данные послужат научной основой для целенаправленного поиска природных фенольных соединений с высокой активностью для создания на их основе эффективных лекарственных средств.

HYDROLYSABLE TANNINS FROM *EUPHORBIA* PLANT *SPECIES*

Abdulladjanova N.G., Mavlyanov S.M., Salikhov Sh.I., Kamaev F.G.

Institute of bioorganic chemistry, Academy of Sciences Republic of Uzbekistan
e-mail: anodira73@rambler.ru

From the investigated kinds of plants of Euphorbia species more than 70 phenolic compounds have been isolated and their chemical structure were established. In the course of studying of phenolic compounds of plants Euphorbia many of them were new, earlier not described in the literature compounds. The chemical structures of that compounds were established by physical and chemical and spectral analysis.

3-O-galloyl-1,2-valoneoyl-β-D-glucose- isolated from E.helioscopus L. $C_{34}H_{26}O_{23}$, melting temperature 215-217^{0}C, $[\alpha]_D$ +33^0 (c 0.5, MeOH), ^{13}C-NMR-(50 MHz, $Me_2CO–d_6$ +D_2O, ppm) δ: 92.34 (C-1), 75.38 (C-2), 78.0 (C-3), 70.6 (C-4), 72.6 (C-5), 63.6 (C-6)-glucose; 120.6 (C-1), 109.6 (C-2), 144.8 (C-3), 139.4 (C-4), 145.3 (C-5), 109.9 (C-6), 166.2 (C-7)-galloyl group; 114.4 (C-1), 126.5 (C-2), 102.6 (C-3), 144.9 (C-4), 136.1 (C-5), 144.5 (C-6), 169.5 (C-7), 116.6 (C-1`), 126.0 (C-2`), 113.0 (C-3`), 146.7 (C-4`), 135.3 (C-5`), 145.0 (C-6`), 168.3 (C-7`), 111.5 (C-1``), 135.5 (C-2``), 140.6 (C-3``), 139.9 (C-4``), 143.0 (C-5``), 110.2 (C-6``), 164.1 (C-7``)-valoneoyl group.

2-O-galloyl-4,6-valoneoyl-β-D-glucose- isolated from E.turkestanica Rgl., $C_{41}H_{29}O_{27}$, $[\alpha]^{20}_D$ -28^0 (c 0.5, MeOH), melting temperature 228-230°C. ^{13}C-NMR-(50 MHz, $Me_2CO–d_6$ +D_2O, ppm) δ: 92.3 (C-1), 76.7 (C-2), 76.9 (C-3), 69.6 (C-4), 73.3 (C-5), 63.3 (C-6)-glucose; 119.8 (C-1), 109.4 (C-2), 146.0 (C-3), 139.9 (C-4), 146.0 (C-5), 110.5 (C-6), 165.4 (C-7)-galloyl group; 115.9 (C-1), 126.1 (C-2), 107.7 (C-3), 145.2 (C-4), 136.7 (C-5), 144.7 (C-6), 167.6 (C-7), 117.8 (C-1`), 126.1 (C-2`), 106.1 (C-3`), 146.8 (C-4`), 137.4 (C-5`), 144.7 (C-6`), 167.8 (C-7`), 115.3 (C-1``), 137.5 (C-2``), 140.4 (C-3``), 139.8 (C-4``), 143.3 (C-5``), 110.1 (C-6``), 167.8 (C-7``)- valoneoyl group.

1,2-di-O-galloyl-4,6- valoneoyl-β-D-glucose-isolated from E.jaxartica Prokh., $C_{41}H_{29}O_{27}$, melting temperature 240-242^{0}C (with decomposition). ^{13}C-NMR-(50 MHz, $Me_2CO–d_6$ +D_2O, ppm) δ: 95.3 (C-1), 76.5 (C-2), 76.9 (C-3), 69.4 (C-4), 73.2 (C-5), 63.2 (C-6)-glucose; 119.4 (C-1), 110.0 (C-2), 145.7 (C-3), 139.4 (C-4), 146.0 (C-5), 110.2 (C-6), 162.8 (C-7)-galloyl group; 116.0 (C-1), 125.7 (C-2), 106.0 (C-3), 146.8 (C-4), 137.3 (C-5), 144.8 (C-6), 168.5 (C-7), 117.8 (C-1`), 126.1 (C-2`), 106.1 (C-3`), 146.8 (C-4`), 137.4 (C-5`), 144.7 (C-6`), 169.3 (C-7`), 114.3 (C-1``), 137.6 (C-2``), 140.2 (C-3``), 140.0 (C-4``), 142.7 (C-5``), 110.5 (C-6``), 167.0 (C-7``)- valoneoyl group.

1,2-di-O-galloyl-3,6- valoneoyl-β-D-glucose-isolated from E.triodonta Prokh. $C_{41}H_{29}O_{27}$, ^{13}C-NMR-(50 MHz, $Me_2CO–d_6$ +D_2O, ppm) δ: 96.5 (C-1), 76.7 (C-2), 76.9 (C-3), 69.6 (C-4), 73.3 (C-5), 63.4 (C-6)-glucose; 120.0 (C-1), 110.1 (C-2), 145.3 (C-3), 146.0 (C-4), 145.8 (C-5), 110.2 (C-6), 165.6 (C-7)-galloyl group; 114.2 (C-1), 125.1 (C-2), 107.5 (C-3), 145.8 (C-4), 136.6 (C-5), 145.2 (C-6), 167.4 (C-7), 122.1 (C-1`), 132.8 (C-2`), 111.2 (C-3`), 151.7 (C-4`), 135.7 (C-5`), 148.6 (C-6`), 167.0 (C-7`), 111.7 (C-1``), 141.3 (C-2``), 137.1 (C-3``), 143.4 (C-4``), 143.8 (C-5``), 109.9 (C-6``), 163.0 (C-7``)- valoneoyl group

1-O-bisgalloyl-2,4- valoneoyl-β-D-glucose-isolated from E. Kudrjaschevii Pazij., $C_{41}H_{30}O_{27,}$ ^{13}C-NMR-(50 MHz, $Me_2CO–d_6$ +D_2O, ppm) δ: 92.2 (C-1), 75.1 (C-2), 78.5 (C-3), 66.8 (C-4), 73.9 (C-5), 63.3 (C-6)- glucose; 119.8 (C-1), 108.4 (C-2), 146.0 (C-3), 139.6 (C-4), 145.0 (C-5), 112.2 (C-6), 166.8 (C-7)- galloyl group; 114.3 (C-1), 126.5 (C-2), 106.8 (C-3), 145.1 (C-4), 136.1 (C-5), 144.5 (C-6), 169.5 (C-7), 116.8 (C-1`), 126.0 (C-2`), 102.5 (C-3`), 146.8 (C-4`), 135.6 (C-5`), 145.0 (C-6`), 168.2 (C-7`), 111.4 (C-1``), 135.6 (C-2``), 140.6 (C-3``), 140.2 (C-4``), 143.3 (C-5``), 110.0 (C-6``), 164.2 (C-7``)- valoneoyl group.

1-O-galloyl-2,4- valoneoyl -3,6-hexahydroxydiphenoyl-β-D-glucose - isolated from E. rosularus (A.Teod), $C_{48}H_{32}O_{31}$, ^{13}C-NMR-(50 MHz, $Me_2CO–d_6$ +D_2O, ppm) δ: 92.5 (C-1), 74.2 (C-2), 75.2 (C-3), 70.8 (C-4), 73.1 (C-5), 63.2 (C-6)- glucose; 120.4 (C-1), 110.2 (C-2), 145.8 (C-3), 139.1 (C-4), 145.8 (C-5), 110.2 (C-6), 165.3 (C-7)-galloyl group; 114.2 (C-1), 126.5 (C-2), 106.9 (C-3), 145.1 (C-4), 135.7 (C-5), 144.4 (C-6), 168.2 (C-7), 122.0 (C-1`), 132.2 (C-2`), 111.1 (C-3`), 151.6 (C-4`), 135.6 (C-5`), 148.7 (C-6`), 168.3 (C-7`), 113.1 (C-1``), 141.1 (C-2``), 137.1 (C-3``), 143.4 (C-4``), 143.7 (C-5``), 110.5 (C-6``), 163.1 (C-7``)- valoneoyl group.

Isolated compounds were transferred to the «Institute of immunology of medical and biologic agency» the Russian Federation, scientific research institute of Virology and Republican Patalogo-anatomic Centre for research their biological, in particular, antiviral activity with the aim of revealing their structure-function relationship. The obtained data will form a scientific basis for purposeful search of natural phenolic compounds with high activity for creation on their basis of effective medical drags.

НОВЫЕ ПРОАНТОЦИАНИДИНЫ *VITIS VINIFERA*

Абдулладжанова Н.Г., Мавлянов С.М., Далимов Д.Н., Камаев Ф.Г.

Институт биоорганической химии АН РУз, Ташкент, Узбекистан
e-mail: anodira73@rambler.ru

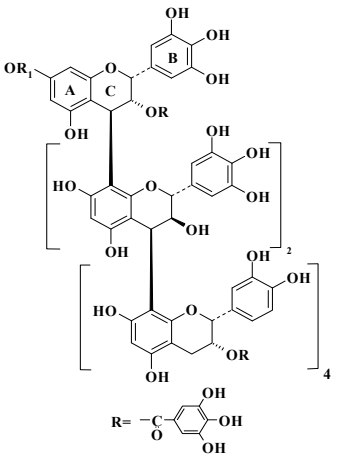
Ранее из косточек винограда Vitis vinifera были выделены два проантоцианидина (ПА) и установлено их химическое строение: ПА-1 - (-)-эпикатехингаллат-7-О-(-β-D-Glcp)-(4β→8)-(±)-галлокатехин-(4β→8)-(-)-эпикатехингаллат-(4β→8)-(+)-катехин-5-О-(β-D-Glcp); ПА-2- (-)-эпигаллокатехин-3-О-галлат-7-О-(-β-D-Glcp)-(4β→8)-[(-)-галлокатехин]$_2$-(4β→8)-[(-)-эпигаллокатехин-3-О-галлат]$_2$ [1].

Продолжив изучение полифенолов этого растения, нами выделены еще два проантоцианидина (ПА-3 и ПА-4).

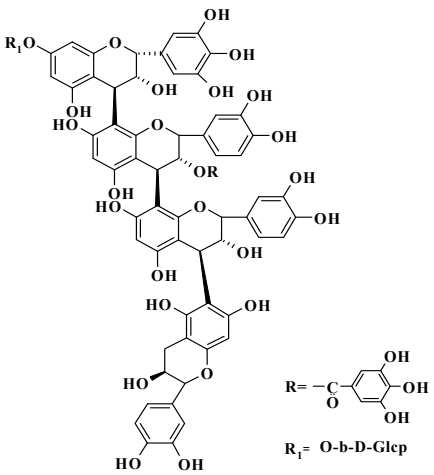
ПА-3 – $C_{146}H_{108}O_{70}$, Мм 2980, УФ-спектр (λ_{max}, МеОН, нм): 220-278; ИК-(ν_{max}, KBr, см$^{-1}$)- спектр: 3500-3200 (ОН), 2935, 1495 (-СН-, CH_2-), 1625, 1545, 1510, 1435 (аром.коль), 1320, 1200 (=С-О), 1270, 1040 (=С-О-С); ПМР- спектр (200 МГц, δ, ацетон-d_6, м.д.): 4.62, 4.80 (2Н, д, J=7 Гц, Н-2, Н-4 верх. блок), 5.90 (2Н, с, J=2 Гц, Н-6, Н-8 кольцо А), 5.28, 5.07, 4.84 (3Н, с, J=2, 7 Гц, Н-2, Н-3, Н-4 нижн.блок), 6.12 (1Н, с, J=2 Гц, Н-8 нижн.блок), 7.03-7.10 (2Н, с, галлоил. гр.), 3.9-3.4 (6Н, J=2, 12 Гц, сахар.часть); ^{13}С-ЯМР-(50 МГц, ацетон–d_6 +D_2O, м.д.): 78.4 (С-2, верх. блок), 69.1 (С-3), 34.6 (С-4), 80.3 (С-2, нижн. блок)- кольцо- С; 96.9 (С-6, С-8, верх. блок,), 156.7, 157.8 (С-5, 7, 9), 106.8 (С-8, нижн. блок), 101.8, 103.8 (С-10)- кольцо-А; 106.7 (С`-2, С`-6), 130.0, 132.1 (С`-1, С`-4), 145.8 (С`-3, С`-5)- кольцо-В; 164.1 (-СОО-); 121.2 (С``-1), 109.7 (С``-2, 6), 146.8 (С``-3, 5), 140.0 (С``-4)- галлоильная гр.; 92.37, 76.77, 76.99, 69.66, 73.38, 63.40 – сахарная часть. На основании полученных данных структура вещества определена как (-)-эпигаллокатехин-3-О-галлат-7-О-(-β-D-Glcp)-(4β→8)-[(-)-галлокатехин]$_2$-(4β→8)-[(-)-эпикатехин]$_4$.

ПА-4 - $C_{73}H_{64}O_{34}$, Мм 1484, УФ-спектр (λ_{max}, МеОН, нм,): 245-310; ИК-(ν_{max}, KBr, см$^{-1}$)- спектр: 3400-3200 (ОН), 2930, (-СН-), 1617, 1540,1445 (аром.коль), 1330, 1250 (=С-О), 1275, 1045 (=С-О-С); ПМР- спектр (200 МГц, δ, ацетон- d_6, м.д.): 4.89, 3.96 (2Н, с, J=2 Гц, Н-2,Н-3 верх.блок), 4.42 (1Н, д, J=7 Гц, Н-4 верх.блок), 6.00-6.20 (2Н, м, J=2 Гц, Н-6, Н-8 верх.блок), 5.28, 5.07, 4.08 (3Н, с, J=8 Гц, Н-2, Н-3, Н-4 нижн.блок), 6.12 (с, Н-8, нижн.блок), 7.03-7.10 (2Н, с, галлоил-гр.), 4.00.-3.4 (сахар.часть). Верхнее положение флаван-3-ола занимает 2,3-цис-концигурацией. ^{13}С-ЯМР-(50 МГц, ацетон –d_6 +D_2O, м.д.): 77.2 (С-2, верх. блок), 73.5 (С-3), 38.8 (С-4), 83.7 (С-2, нижн. блок)- кольцо- С; 95.3, 96.57 (С-6, С-8, верх. блок,), 152.4, 154.46, 155.9 (С-5, 7, 9), 106.7 (С-6, нижн. блок), 107.36 (С-8, сред. блок), 101.2, 99.3 (С-10)- кольцо-А; 115.6, 106.7 (С`-2, С`-6), 130.6 (С`-1), 145.1 (С`-3, 4,5), - кольцо-В; 166.8 (-СОО-); 120.74 (С``-1), 110.4 (С``-2, 6), 144.8 (С``-3, 5), 139.5 (С``-4)- галлоильная гр.; 93.8, 71.8, 73.3, 70.8, 73.1, 63.1 – сахарная часть. На основании полученных данных структура вещества определена как (±)-галлокатехин-7-О-(-β-D-Glcp)-(4β→8)-(-)–эпикатехингаллат-(4β→8)-(-)-эпикатехин-(4β→6)-(+)-катехин. Это новые, ранее не описанные в литературе соединения.

Выявлено, что выделенные соединения обладают антигипоксическим, мембраностабилизирующим, антиоксидантным, ангиопротекторным, антисклеротическим действиями.



R_1=β-D-Glcp



Литература:

1.*Пирниязов А.Ж., Мавлянов С.М., Абдулладжанова Н.Г., Камаев Ф.Г., Далимов Д.Н.* Полифенолы косточек винограда.// Химия природ. соедин. 2003, с.232-236

NEW PROANTHOCYANIDINS FROM *VITIS VINIFERA*

Abdulladjanova N.G., Mavlyanov S.M., Kamaev F.G., Dalimov D.N.

Institute of bioorganic chemistry, Academy of Sciences Republic of Uzbekistan
e-mail: anodira73@rambler.ru

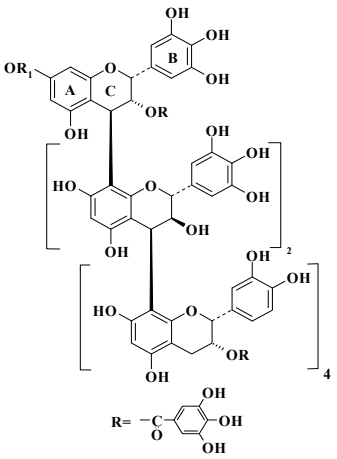
From Vitis vinifera grape seeds two proanthocyanidins (PAS) have been isolated before and their chemical structure were established as PA-1 - (-)-epicatechin gallate-7-O-(-β-D-Glcp)-(4β→8)-(±)-gallocatechin-(4β→8)-(-)-epicatechin gallate-(4β→8)-(+)-catechin-5-O-(β-D-Glcp); PA-2- (-)-epigallocatechin-3-O-gallate-7-O-(-β-D-Glcp)-(4β→8)-[(-)-gallocatechin]$_2$-(4β→8)-[(-)- epigallocatechin-3-O-gallate]$_2$ [1].

Continuing the study of polyphenols of this plant, two more new proanthocyanidins (PA-3 and PA-4) were isolated by us.

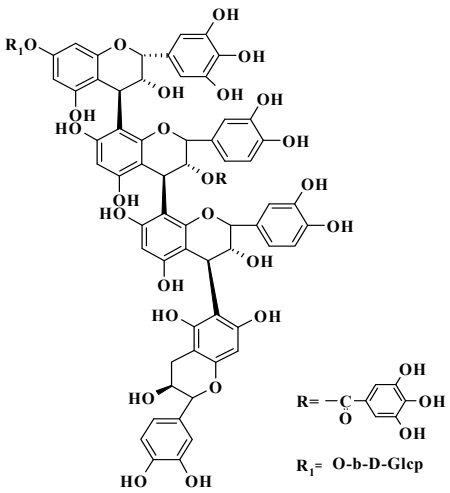
PA-3 – $C_{146}H_{108}O_{70}$, Mw 2980, UV-(λ_{max}, MeOH, nm): 220-278; IR-(ν_{max}, KBr, cm^{-1}): 3500-3200 (OH), 2935, 1495 (-CH-, CH_2-), 1625, 1545, 1510, 1435 (arom. ring), 1320, 1200 (=C-O), 1270, 1040 (=C-O-C); ^{1}H- NMR (200 MHz, Me_2CO -d_6, ppm) δ: 4.62, 4.80 (2H, d, J=7 Hz, H-2, H-4 extension unit), 5.90 (2H, s, J=2 Hz, H-6, H-8: ring A), 5.28, 5.07, 4.84 (3H, s, J=2, 7 Hz, H-2, H-3, H-4 terminal unit), 6.12 (1H, s, J=2 Hz, H-8 terminal unit), 7.03-7.10 (2H, s, galloyl group), 3.9-3.4 (6H, J=2, 12 Hz, glucose core); ^{13}C-NMR-(50 MHz, Me_2CO–d_6 +D_2O, ppm) δ: 78.4 (C-2, extension unit), 69.1 (C-3), 34.6 (C-4), 80.3 (C-2, terminal unit)- ring C; 96.9 (C-6, C-8, extension unit), 156.7, 157.8 (C-5, 7, 9), 106.8 (C-8, terminal unit), 101.8, 103.8 (C-10)- ring A; 106.7 (C`-2, C`-6), 130.0, 132.1 (C`-1, C`-4), 145.8 (C`-3, C`-5)- ring B; 164.1 (-COO-); 121.2 (C``-1), 109.7 (C``-2, 6), 146.8 (C``-3, 5), 140.0 (C``-4)- galloyl group.; 92.37, 76.77, 76.99, 69.66, 73.38, 63.40 – glucose core. By means of physical and chemical and spectral data structures of this compound has been established as(-)-epigallocatechin-3-O-gallate-7-O-(-β-D-Glcp)-(4β→8)-[(-)- gallocatechin]$_2$-(4β→8)-[(-)-epicatechin]$_4$.

PA-4 - $C_{73}H_{64}O_{34}$, Mw 1484, UV-(λ_{max}, MeOH, nm): 245-310; IR-(ν_{max}, KBr, cm^{-1}): 3400-3200 (OH), 2930, (-CH-), 1617, 1540,1445 (arom.ring), 1330, 1250 (=C-O), 1275, 1045 (=C-O-C); NMR (200 MHz, Me_2CO -d_6, ppm) δ: 4.89, 3.96 (2H, s, J=2 Hz, H-2,H-3 extension unit), 4.42 (1H, d, J=7 Hz, H-4 extension unit), 6.00-6.20 (2H, m, J=2 Hz, H-6, H-8 extension unit), 5.28, 5.07, 4.08 (3H, s, J=8 Hz, H-2, H-3, H-4 terminal unit), 6.12 (s, H-8, terminal unit), 7.03-7.10 (2H, s, galloyl group), 4.00.-3.4 glucose core. The top position of flavan-3-ol occupies 2,3- cis configuration. ^{13}C-NMR-(50 MHz, Me_2CO–d_6 +D_2O, ppm) δ: 77.2 (C-2, extension unit), 73.5 (C-3), 38.8 (C-4), 83.7 (C-2, terminal unit)- ring C; 95.3, 96.57 (C-6, C-8, extension unit), 152.4, 154.46, 155.9 (C-5, 7, 9), 106.7 (C-6, terminal unit), 107.36 (C-8, middle (intermediate) unit), 101.2, 99.3 (C-10)- ring A; 115.6, 106.7 (C`-2, C`-6), 130.6 (C`-1), 145.1 (C`-3, 4,5) – ring B; 166.8 (-COO-); 120.74 (C``-1), 110.4 (C``-2, 6), 144.8 (C``-3, 5), 139.5 (C``-4)- galloyl group; 93.8, 71.8, 73.3, 70.8, 73.1, 63.1 – glucose core. On the basis of the received data the structure of the compound was identified as (±)-gallocatechin -7-O-(-β-D-Glcp)-(4β→8)-(-)–epicatechin gallate-(4β→8)-(-)-epicatechin-(4β→6)-(+)-catechin. All of them new compounds.

It is determined, that isolated compounds have antihypoxic, antioxidant, membrane stabilizing, angioprotector and antisclerotic actions.



R_1=β-D-Glcp



References:

1.*Pirniyazov A.J., Mavlyanov S.M., Abdulladjanova N.G., Kamaev F.G., Dalimov D.N.* Polyphenols of grape seeds// Chemistry of Natural Compounds. -2003, P.232-236.

ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД ОЛІЇ З НАСІННЯ РОСЛИН РОДИНИ BRASSICACEAE

[1]Андрущенко О.Л., [1]Грахов В.П., [1]Рахметов Д.Б., [2]Жукова Я.Ф.

[1] Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України, Київ, Україна
[2] Технологічний інститут молока та м'яса НААН України, Київ, Україна
e-mail: helen.amaranth@gmail.com

Визначальну роль для напряму використання олій є їх жирнокислотний склад. Зокрема, для олій з насіння рослин родини капустяних (*Brassicaceae*) суттєвим показником виступає вміст такої речовини, як ерукова кислота. Так, в більшості країн Євросоюзу харчову олію виробляють лише з тих сортів ріпаку, що містять її до 2 %. В Україні також, на сьогодні, розглядається проект наказу Мінагрополітики «*Про встановлення максимального рівня ерукової кислоти в оліях, жирах та їх сумішах…*», що передбачає "*встановити максимальний вміст ерукової кислоти від загального рівня жирних кислот у харчових продуктах не більше 2 %, а в сумішах олій та жирах, що призначені для промислової переробки, – не більше 5 %*". При виробництві пластифікаторів, лаків та фарб цінними є сорти з високим вмістом ерукової кислоти.

Для характеристики окремих зразків *Brassicaceae* з колекції Національного ботанічного саду (НБС) ми дослідили жирнокислотний склад олій з насіння суріпиці ярої, ріпаку озимого, тифону та еруки посівної. З аліквот екстрагованих гексаном препаратів отримували зразки метилових ефірів, які аналізували методом капілярної газової хроматографії. Негідролізовані препарати аналізували методом неводної обернено-фазової високоефективної рідинної хроматографії, отримуючи тригліцеридні профілі.

Олії насіння капустяних культур належать до ерукової та неерукової (олеїно-лінолевої) груп. До першої відноситься олія тифону та еруки – 48,7 і 47,5 % ерукової кислоти, відповідно; до другої групи – олії ріпаку і суріпиці, що містять даної кислоти лише 0,7 та 1,9 %. Основною же складовою їх є олеїнова кислота, що міститься у вигляді дилінолеатолеату, лінолеатдиолеату та мінорного триолеату. Вміст цієї мононенасиченої жирної кислоти в цих оліях сягає 62,4 та 48,1 %. У зразках ерукової групи одночасно великий вміст гондолеїнової кислоти (до 10 %), а неерукової – лише близько 2 %. У олії суріпиці в складі тригліцеридів частина олеїнової заміщена (до 11,2 %) пальмітиновою кислотою, до того ж з високим вмістом легких (C_6-C_{14}) кислот до 4,1 %, забезпечуючи такій олії меншу в'язкість та інші властивості, що робить її цінною сировиною для виробництва біодизелю.

Лінолева кислота відноситься до так званих незамінних жирних кислот, необхідних для нормальної життєдіяльності організму. У людини вона засвоюється з тригліцеридів та фосфатидів. Олії ріпаку та суріпиці містять до 20 % лінолевої кислоти. Ця кислота представлена у вигляді трилінолеату, ділінолеатолеату та лінолеатдіолеату. У еруки та тифону лінолевої кислоти виявлено приблизно вдвічі менше – близько 10 %. Поліненасичена α-ліноленова кислота, що належить до *ω*-3, у досліджуваних видів міститься в кількості 6,4-10,8 % від суми жирних кислот. Найбільше її виявлено в олії еруки посівної. Важливу функцію має також вже зазначена пальмітинова кислота – це основна насичена жирна кислота, що міститься в грудному молоці і дитячих сумішах (до 45-50 %). У досліджуваних нами оліях найбільший вміст її виявлено, як вказано вище, у суріпиці (11,2 %), середній рівень – у ріпака та еруки (4,1 і 5,2 %), а найменше – у тифона (2,7 %). Слід зазначити також, що жирнокислотний склад олії з насіння чотирьох видів *Brassicaceae* може вказувати на мало поширені жирні кислоти як маркери при ідентифікації олійної сировини. Так, лігноцеринова кислота імовірно притаманна тифону, а бегенова – еруці. У суріпиці, єдиної із чотирьох зразків, виявлено в незначній кількості міристоолеїнову кислоту, а у ріпаку – пальмітоолеїнову.

Таблиця. Жирні кислоти в олії насіння рослин *Brassicaceae* з колекції НБС НАН України

Жирна кислота		*Ерука*	Суріпиця	Ріпак	Тифон
Назва	**Позначення**				
капронова- ундеканова	C 6:0… C 11:0		0,8	0,1	
лауринова	C 12:0	0,3	0,6	0,1	
міристинова	C 14:0	0,6	2,4	0,2	1,7
міристоолеїнова	C 14:1		0,3		
пальмітинова	C 16:0	5,2	11,2	4,1	2,7
пальмітоолеїнова	C 16:1			0,2	
стеаринова	C 18:0	1,4	4,2	2,1	1,5
олеїнова	C 18:1 n 9 c	11,7	48,1	62,4	12,9
лінолева	C 18:2 n 6 c	9,7	19,0	19,9	9,9
α-ліноленова	C 18:3 n 3	10,8	6,7	7,6	6,4
гондолеїнова	C 20:1 n 9	9,3	2,3	2,2	9,9
бегенова	C 22:0	0,5			
ерукова	C 22:1 n 13	47,5	1,9	0,7	48,7
лігноцеринова	C 24:0				1,2

Література:

1. *Adlof R.O., Gunstone F.D.* Common (non-systematic) names for fatty acids. American Oil Chemists' Society. Analytical Division. 2010.- http://www.aocs.org/Membership/content.cfm?ItemNumber=1068
2. *Seyis F., Friedt W.* Brassica oleracea genotypes displaying interesting fatty acid profiles for Brassica napus breeding // African Journal of Agricultural Research, 2010.- 5(23).- 3191-3195.

FATTY ACID COMPOSITION OF *BRASSICACEAE* PLANT SEED OILS

[1]Andruschenko O.L., [1] GrakhovV.P., [1]Rakhmetov D.B., [2]Zhukova Ya.F.

[1] M.M.Grishko National Botanical Garden of Nat. Acad. of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
[2] Dairy and Meat Technological Institute of Nat. Acad. of Agricultural Sciences, Kyiv, Ukraine
e-mail: helen.amaranth@gmail.com

Determinative role for the use of oils and fats belongs to their fatty acid composition. In particular, for oils from cruciferous plants (*Brassicaceae*) a substantial parameter is the content of such substance as erucic acid. Like this in most countries of European Union food oil is manufactured only from those rape cultivars that contain it up to 2%. In Ukraine, presently, the draft project of the Ministry for Agrarian Policy under title "*About setting maximal level of erucic acid in oils, fats and their mixtures…*" is examined. It provides "*to set maximum content of erucic acid relative to general level of fatty acids in food products not more than 2%, but in mixtures of oils and fats which are intended for the industrial processing – not more 5%*". In manufacturing plasticizers, varnishes and paints the cultivars with high content of erucic acid are valuable.

For the description of several samples of cruciferous plants from the collection of National Botanical Garden we have investigated fatty acid composition in oils from the seed of spring coleseed, winter rape, tyfon and common eruca. From the aliquots of preparations extracted by hexane the samples of methyl ethers have been obtained and analyzed by capillary gas chromatography. Not hydrolyzed aliquots of the preparations have been separated by non-aqueous reverse-phase high-performance liquid chromatography resulting in triglyceride profiles.

Based on fatty acid composition the oil samples of studied plants belong to erucic and non-erucic (oleic-linolic) group. Tyfon and eruca oils belong to the first group – 48,7 and 47,5% erucic acid, respectively, rape and coleseed oils fall in the second group and contain only 0,7 and 1,9% this acid. The main constituent of them is oleic acid which is contained as dilinoleate-oleate, linoleate-dioleate and minor trioleate. The content of this monounsaturated fatty acid in above oils arrives 62,4 and 48,1 %. Besides erucic acid the samples of erucic group contain much gondoleic acid (to 10 %), and the samples of oleic-linolic – only near 2 %. Among triglycerides of coleseed oil the oleic acid partly substituted (to 11,2%) by palmitic acid together with high percentage of short chain (C_6-C_{14}) acids to 4,1%, providing to the oil less viscidity and other properties friendly to process into biodiesel.

Linolic acid behaves to the so-called irreplaceable fatty acids necessary for normal functions of human organism where it is assimilated from triglycerides and phospholipids. Rape and coleseed oils contain up to 20 % linolic acid. This acid is presented in the form of trilinoleate, dilinoleate-oleate and linoleate-dioleate. In eruca and tyfon oils its content reduces to approximately by half – about 10 %. In the investigated species polyunsaturated *α*-linolenic acid which belongs to *ω*-3 contained in amount 6,4-10,8% the sum of fatty acids. Most of it we have found in eruca oil. Above mentioned palmitic acid is also of important function: it is the basic saturated fatty acid which is contained in breast milk and baby's formulas (to 45-50 %). Among studied oils the high level of palmitic acid was observed in coleseed oil (11,2%), the middle level – in rape and eruca oils (4,1 and 5,2 %), and the least – in tyfon oil (2,7 %). It should be also noted, that fatty acid composition of oil from the seeds of four *Brassicaceae* species can determine fatty acids with low content as markers upon authentication of oil-bearing plant raw material. So, lignoceric acid is probably inherent to the tyfon, and behenic – to eruca. In coleseed oil, the only from four samples, myristoleic acid is discovered in negligible quantity, and in rape oil – palmitoleic.

Table. Fatty acids in *Brassicaceae* plant seed oils from the collections of National Botanical Garden of NAS of Ukraine

Fatty acid		Eruca sativa	Coleseed, Brassica campestris	Rape, Brassica napus	Tyfon, Brassica campestris×B.rapa
Common name	Structure				
caproic…undecanoic	6:0… 11:0		0,8	0,1	
lauric	12:0	0,3	0,6	0,1	
myristic	14:0	0,6	2,4	0,2	1,7
myristoleic	9c-14:1		0,3		
palmitic	16:0	5,2	11,2	4,1	2,7
palmitoleic	9c-16:1			0,2	
stearic	18:0	1,4	4,2	2,1	1,5
oleic	9c-18:1	11,7	48,1	62,4	12,9
linolic	9c12c-18:2	9,7	19,0	19,9	9,9
α-linolenic	9c12c15c-18:3	10,8	6,7	7,6	6,4
gondoleic	9c-20:1	9,3	2,3	2,2	9,9
behenic	22:0	0,5			
erucic	13c-22:1	47,5	1,9	0,7	48,7
lignoceric	24:0				1,2

References

1. *Adlof R.O., Gunstone F.D.* Common (non-systematic) names for fatty acids. American Oil Chemists' Society. Analytical Division. 2010. http://www.aocs.org/Membership/content.cfm?ItemNumber=1068
2. *Seyis F., Friedt W.* Brassica oleracea genotypes displaying interesting fatty acid profiles for Brassica napus breeding // African Journal of Agricultural Research, 2010.- 5(23).- 3191-3195.

СКВАЛЕН В ОЛІЇ З НАСІННЯ РІЗНИХ СОРТІВ ЩИРИЦІ (AMARANTHUS L.)

Андрущенко О.Л., Грахов В.П., Рахметов Д.Б.

Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України, Київ, Україна
e-mail: helen.amaranth@gmail.com

Серед багатьох біологічно активних сполук особливу увагу привертає сквален (також спінацен) $C_{30}H_{50}$ (2,6,10,15,19,23-гексаметил-2,6,10,14,18,22-тетракоза-гексаен). Цей поліненасичений вуглеводень з групи аліциклічних тритерпенів із шістьма подвійними зв'язками є вузловою ланкою в ліпідному біосинтезі, а саме попередником тритерпеноїдів та стероїдів (стероїдних фітоестрогенів у рослин й стероїдних гормонів у тварин), жовчних кислот та убіхінону [1].

Біологічна активність сквалену інтенсивно досліджується. Експериментально підтверджено протипухлинну дію скваленовмісних препаратів на ранніх стадіях захворювання [2]. Сквален також є перспективною діючою речовиною при терапії дерматозів (екземи, псоріази и трофічні виразки, опіки), а також активною складовою багатьох косметичних композицій. У організмі людини ця речовина присутня в усіх тканинах з найбільшим вмістом у шкірі, де вона виступає ефективним антиоксидантом, має бактерицидну та фунгіцидну дію, відновлює структуру епідермальних ліпідів.

Взагалі сквален широко розповсюджений у тваринному і рослинному світі, зокрема в рослинних оліях – оливковій, бавовняній, лляній, пальмоядровій . Проте найбільший його вміст виявлено в амарантовій олії, одержаній з насіння щириці (*Amaranthus* L.) – до 6 % і більше [3].

Щириця – одна з найдавніших зернових культур, увага до якої натепер зростає в усьому світі. Окрім цінного рослинного протеїну, вміст сквалену в амарантовій олії та препаратах на її основі є одним з визначальних показників перспективності культиварів, сортів, форм та гібридів щириці.

Ми досліджували вміст сквалену в олії з насіння щириці ряду сортів селекції Національного ботанічного саду НАН України (*Кремовий ранній, Кармін, Стерх, Жайвір, Рушничок* та *Геліос*) урожаю 2009 р. Зразки екстрагували з ретельно подрібненого насіння легким петролейним ефіром при кімнатній температурі і відсутності світла протягом 2-3 діб, фільтрували крізь щільний паперовий фільтр і упарювали. Після перерозчинення в ізопропанолі здійснювали аналіз методом неводної обернено-фазової рідинної хроматографії на рідинно-хроматографічній системі *Agilent 1100*. Застосовували ізократичний елюент складу ізопропанол / ацетонітрил (1:1) на колонці ZORBAX Eclipse XDB-C_{18} , 4.6×150 mm, 5 µm при t=20°C. Детектування здійснювали при 206 (додатково 224 та 254) нм. Як стандарт використовували чистий сквален від Sigma-Aldrich. Обробку та візуалізацію хроматограм проводили за допомогою програмного забезпечення *Agilent Chemstation* та *Corel Draw X3 (Рисунок)*.

Виявлено, що у досліджених сортів щириці вміст сквалену в олії варіює в межах 4,74-6,35 % (*Таблиця*), тобто детермінований генетичними розбіжностями. З іншого боку, для 3-х зразків перспективного сорту *Геліос*, з різних місцевостей в межах Київської області накопичення сквалену в насінні істотно залежить і від умов зростання, агротехніки тощо. Так зразок сорту Геліос**, зібраний в с. Бурти мав найвищий вміст сквалену (6,35 %), тоді як у того ж сорту (*) з с. Глеваха цей показник був значно меншим (4,80 %). Таким чином, для отримання найбільш цінної амарантової олії існують і селекційні, і агрономічні резерви. Важливим завданням також є стандартизована методика визначення сквалену.

Таблиця. Вміст сквалену в олії з насіння щириці сортів селекції НБС НАН України

Сорт щириці	Сквален, %
Стерх	5,15
Жайвір	5,48
Рушничок	5,72
Кремовий ранній	5,24
Кармін	4,74
Геліос	5,43
*Геліос **	4,80
*Геліос ***	6,35

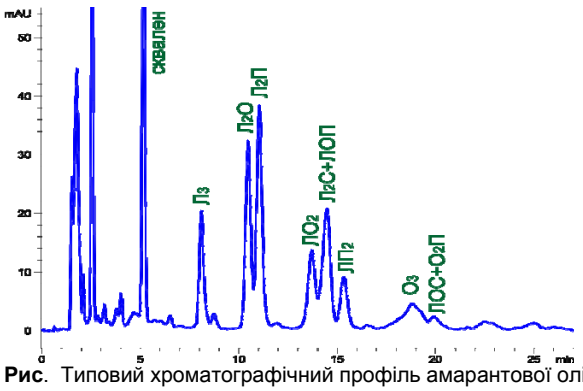


Рис. Типовий хроматографічний профіль амарантової олії (неводна обернено-фазова високоефективна рідинна хроматографія). Позначки жирних кислот у тригліцеридах:
Л – линолева; О – олеїнова; П – пальмітинова; С – стеаринова.

Література:

1. *Дейнека Л.А., Дейнека В.И., Гостищев И.А., Сорокопудов В.Н., Сиротин А.А.* Определение сквалена в семенах некоторых растений семейства Amaranthaceae // Химия растительного сырья. – 2008. – № 4. – С. 69-74.
2. *Kelly G.S.* Squalene and its potential clinical uses // Altern Med Rev., 1999.- V.4. – P. 29-36.
3. *Кретов И.Т., Соболев С.Н., Мирошниченко Л.А., Жаркова И.М.* Масло из семян амаранта // Масложировая промышленность. – 2006. – № 1. – С. 22-23.

SQUALENE IN OIL FROM DIFFERENT CULTIVARS OF PIGWEED (*AMARANTHUS* L.)

Andrushchenko O.L., Grakhov V.P., Rakhmetov D.B.

M.M.Grishko National Botanical Garden of Nat. Acad. of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: helen.amaranth@gmail.com

Among great number of biologically active compounds the special attention is attracted by squalene (also spinacene) $C_{30}H_{50}$ (2,6,10,15,19,23-hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaene). This polyunsaturated hydrocarbon from the group of alicyclic triterpenes with six double bonds is the central segment in lipid biosynthesis, namely as the predecessor of triterpenoids and steroids (steroid phytoestrogenes in plant and steroid hormones in animal organisms), bilious acids and ubiquinone (coenzyme Q10) [1].

Biological activity of squalene is intensively studied. The anticancer effect of squalene-containing preparations is experimentally confirmed on the early stages of disease [2]. Squalene also is perspective acting substance in therapy of dermatoses (eczema, psoriases and trophic ulcers, ambustions), and also active constituent of many cosmetic compositions. In human organism this substance being in all tissues with most content in skin, where it comes forward as effective antioxidant having bactericidal and fungicidal effect, preserving and renewing the structure of epidermal lipids.

Generally, squalene is widespread in animal and plant kingdoms, particularly in seed oils - olive, cotton, flax, and palm-kernel. However the highest content is discovered in amaranth oil from pigweed (*Amaranthus L.*) – to 6 % and anymore [3].

Amaranth is one of the oldest grain-crops, presently attention to this plant grows in the whole world. Except valuable vegetable protein, squalene content in amaranth oil and preparations on its base is one of qualificatory parameters for perspective and promising pigweed cultivars, forms and hybrids.

We have studied the content of squalene in oil from pigweed seeds of a number of cultivars in collection of National Botanical Garden of Nat. Acad. of Sciences of Ukraine (‘*Sterkh’, ‘Zhajvir’, ‘Rushnytchok’, ‘Kremovyj rannij’, ‘Karmin’, ‘Helios’*) harvested in 2009. The samples were extracted from carefully grounded seeds by petroleum ether at room temperature and absence of light during 2-3 days, filtered through dense paper filter and evaporated. After redissolving in isopropanol the analysis was carried out by non-aqueous reverse-phase liquid chromatography with HPLC system Agilent 1100. Isocratic eluent consisting of isopropanol / acetonitrile (1:1) on the column ZORBAX Eclipse XDB - C_{18}, 4.6×150 mm, 5 µm at t=20°C was used. Detections carried out at 206 nm (additionally 224 and 254 nm). Pure squalene as standard was purchased from Sigma-Aldrich. HPLC data processing and visualization were conducted by *Agilent Chemstation* and *Corel Draw X3* software (Fig.).

It is shown that among studied pigweed cultivars the squalene content in oils varies within the range of 4,74-6,35 % (Table), thus determined by genetic differences. On the other hand, for three samples of perspective cultivar ‘Helios’ from different localities within Kyiv region the accumulation of squalene in seeds substantially depends on growth conditions, agrotechnics etc. Thus, the sample of ‘Helios’ ** collected in Burty village has the highest squalene level (6,35 %), while this parameter was far fewer (4,80 %) in oil from the same cultivar (*) from Glevakha village. Therefore, for the most valuable amaranth oil there are both plant-breeding and agronomical resources. Also the standardized method for determination of plant oil squalene is the urgent task.

Table. Squalene content in oil from seeds of amaranth cultivars in National Botanical Garden collection

Cultivar of amaranth	Squalene, %
‘Sterkh’	5,15
‘Zhajvir’	5,48
‘Rushnytchok’	5,72
‘Kremovyj rannij’	5,24
‘Karmin’	4,74
‘Helios’	5,43
*‘Helios’ **	4,80
*‘Helios’ ***	6,35

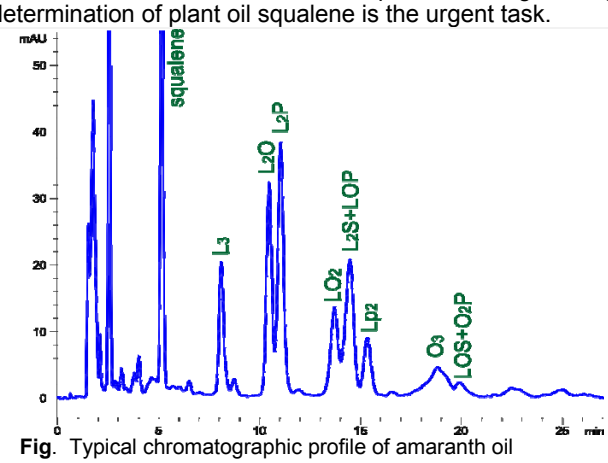


Fig. Typical chromatographic profile of amaranth oil (non-aqueous reverse-phase high-performance liquid chromatography). Abbreviations of fatty acids in triglyceride labels: L – linolic; O – oleic; P – palmitic; S – stearic.

References:

1. *Deineka L.A., Deineka V.I., Gostischev I.A., Sorokopudov V.N., Sirotin A.A.* Determination of squalene in seeds of some plants of *Amaranthaceae* family // Khimija Rastitel’nogo Syrja (Plant Raw Material Chemistry), 2008.- No.4.- P.69-74. /in Russian/
2. *Kelly G.S.* Squalene and its potential clinical uses // Altern Med Rev. – 1999. – V.4. – P.29-36.
3. *Kretov I.T., Sobolev S.N., Miroshnitchenko L.A., Zharkova I.M.* Oil from amaranth seeds // Oil and fat industry (Maslozhirovaja promyshlennost’), 2006.– No.1.– P. 22-23. /in Russian/

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ЭКСТРАКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ЛИСТВЕННИЦЫ КАК ОСНОВА НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Бабкин В.А., Остроухова Л.А., Медведева Е.Н.

Иркутский институт химии им. А.Е.Фаворского Сибирского Отделения РАН, Иркутск, Россия
e-mail: babkin@irioch.irk.ru

Впервые в России осуществляется в промышленном масштабе глубокая переработка всех компонентов древесного сырья с выпуском широкого круга медицинских препаратов по экологически безопасным технологиям. Разработаны способы выделения отдельных компонентов экстрактивных веществ - дигидрокверцетина и арабиногалактана, созданы технологические схемы их промышленного производства. Созданы методы анализа компонентов биомассы лиственницы, удовлетворяющие требованиям сертификации лекарственных веществ. В лечебной практике уже показано, что биологически активные препараты из лиственницы имеют важнейшее значение для профилактики и лечения социальных болезней, таких как грипп, ОРВИ, инфаркт, инсульт, сахарный диабет, злокачественные новообразования.

Использование природных соединений в лечении простудных заболеваний и гриппа - это общемировая тенденция. Натуральные биологически активные вещества, и в первую очередь флавоноиды, постепенно занимают одно из ведущих мест на рынке противовирусных и противовоспалительных препаратов. Примером может служить успешное исследование протективной активности флавоноида дигидрокверцетина и полисахарида арабиногалактана при экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной вирусами различных типов: A(H1N1), A(H5N2) и B. В результате многолетних исследований разработан "Араглин Д" - препарат в виде нанобиокомплекса, полученный механохимическим синтезом. Новый препарат обеспечивает в первую очередь защиту организма от инфекций в период эпидемии гриппа и ОРВИ. В области неврологии для лечения ранних форм сосудистых заболеваний головного мозга целесообразно широко использовать препарат Диквертин, созданный на основе дигидрокверцетина по уникальной технологии авторов. Диквертин, обладая антиагрегантным, гиполипидемическим, вазоактивным и ноотропным действием, оказывает существенное влияние на механизмы развития церебральной ишемии. Препарат может применяться в комплексной терапии острой сосудистой мозговой недостаточности, а также для их вторичной профилактики. Перспективным представляется использование Диквертина при ишемической болезни сердца, сахарном диабете, как с целью терапии этих заболеваний, так и для профилактики возникающих при них осложнений.

BIOLOGICALLY ACTIVE EXTRACTIVES OF LARCH AS THE BASIS FOR NEW MEDICINES

Babkin V.A., Ostroukhova L.A., Medvedeva E.N.

A.E. Favorsky Institute of Chemistry Russian Academy of Sciences Siberian Branch, Irkutsk, Russia
e-mail: babkin@irioch.irk.ru

For the first time in Russia carried out commercially, deep processing of all components of wood raw material with the release of a wide range of medical products for the environmentally safe technologies.

The methods of separating the individual components of extractives - dihydroquercetin and arabinogalactan have been developed and created the technological schemes of their industrial production. .

A method of analysis of the components of the biomass of larch, satisfying the requirements of certification of drugs has been worked out. The medical practice has shown that biologically active preparations of larch are essential for the prevention and treatment of social diseases such as influenza, SARS, heart attack, stroke, diabetes, malignant neoplasm.

Using natural compounds in the treatment of colds and flu - is a worldwide trend. Natural biologically active substances, and especially flavonoids, gradually take a leading position in the market of antiviral and anti-inflammatory drugs. An example would be the successful investigation of protective activity of flavonoid dihydroquercetin and polysaccharide arabinogalactan at experimental influenza infection caused by viruses of different types: A (H1N1), A (H5N2) and B. As a result of many years of research "Araglin D" has been designed. It is the drug in the form of nanobiocomplex obtained by mechanochemical synthesis. The new product provides primarily the protection of the organism from the infections during a flu epidemic and SARS.

In the field of neurology for the treatment of early forms of cerebrovascular diseases it is advisable to make extensive use of the drug Diquertin created on the basis of dihydroquercetin on the unique technology of the authors. Diquertin possessing antiaggregant, hypolipidemic, vasoactive and neuroprotective effects, has a significant influence on the mechanisms of cerebral ischemia. The drug can be used in the treatment of acute cerebral vascular disease, as well as for secondary prevention.The usage of Diquertin can be perspective in coronary heart disease, diabetes mellitus, both with the goal of therapy of these diseases, and prevention of complications arising from them.

ИЗМЕНЕНИЕ ВЫХОДА ЭФИРНОГО МАСЛА У СОРТОВ И ФОРМ МЯТЫ РАЗЛИЧНОГО ГЕОГРАФИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ В СРЕДНЕЙ ПОЛОСЕ РОССИИ

Бидюкова Г.Ф., Смирнова И.М., Олехнович Л.С., Енина О.Л.

Учреждение Российской академии наук Главный Ботанический сад им. Н.В, Цицина РАН; Москва, Россия
e-mail: lab-physiol@mail.ru

Эфирное масло, продуцируемое растениями рода *Mentha* L. широко применяется в медицине, благодаря своим сильно выраженным бактерицидным и антиоксидантным свойствам. В основном эти свойства определяются наличием в масле ментола, ментона и их производных.

Мята используется для получения аптечного листа, не только в южных регионах и Средней полосе России, но и в таежной зоне. Но для использования ее в качестве продуцента эфирного масла необходима сумма эффективных температур вегетационного периода 3200 - 3400°С. Для московского региона этот показатель составляет 2200-2300 °С, однако в последние годы сумма эффективных температур возросла и превысила в 2009г. среднюю многолетнюю на 664°С, а в аномально жарком 2010 г. – на 1211°С. В связи с этим, нами было проанализировано накопление биомассы (листья + соцветия) и выход эфирного масла у растений первого года вегетации ряда сортов и природных форм мяты различного географического происхождения. По преобладающим мажорным компонентам в составе эфирного масла выделяют типы сортов: ментольный, линалоольный, карвонный. В нашем опыте были взяты сорта ментольного типа, где содержание ментола, ментона их производных составляет более 60% от всех компонентов эфирного масла. Растения выращивали на экспериментальном участке в ГБС РАН. Опыты проводились в 2009 и 2010гг. На делянках по 1м^2 высаживали черенки, с 3-4 парами развитых листьев 10 сортов и форм. 5 районированных сортов и 1 форма мяты перечной (*M.piperita* L.): Краснодарская 2, районированный сорт юга России; два сорта, полученных из КИПУ (Украина, Симферополь) - Удайчанка и Украинская перечная; два сорта, полученных из ВИЛАР (Россия, Москва) – Москвичка и Медичка; форма Митчамская; сорт, интродуцированный в среднетаежной зоне, полученный из Института биологии Коми научного центра УрО РАН (Россия, Сыктывкар) - Кубанская 6. Один сорт и 2 формы мяты полевой (*M. arvensis* L.) – одна форма из флоры о.Тайвань и *M. arvensis var. pipiraceus* Holmes (японская мята); сорт вьетнамской селекции - NV-74.

Накопление биомассы и выход эфирного масла на 1м^2 определяли в фазу конца бутонизации – начала цветения. Аномально жаркое лето 2010г. ускорило наступление этой фазы у большинства сортов в среднем на 2-4 недели, но у сорта NV-74 и двух форм мяты полевой изменений в сроках наступления фазы бутонизации - цветения не отмечено.

Эфирное масло получали методом гидродистилляции. Результаты анализов представлены в таблице.

название сорта, формы	2009		2010	
	биомасса, г/м^2	эфирное масло, г/м^2	биомасса, г/м^2	эфирное масло,г/м^2
Краснодарская 2	165.2	3.0	236.3	6.1
Кубанская 6	559.8	11.1	352.5	10.8
Москвичка	366.8	10.9	355.1	12.4
Медичка	574.7	15.9	347.6	14.0
Удайчанка	390.7	10.7	382.5	18.0
Украинская перечная	251.1	7.0	302.6	13.0
Митчамская	478.9	7.6	302.1	10.0
NV-74	508.5	9.7	314.9	12.3
Японская мята	200.2	3.1	202.3	5.2
Тайваньская форма *M. arvensis*	139.0	2.5	226.8	6.0

Следует отметить, что у южных сортов и двух форм мяты полевой аномально высокое превышение суммы эффективных температур над средней многолетней существенно повысило выход эфирного масла, а у сортов Москвичка, Медичка и Кубанская 6 - практически не изменялось.

Таким образом, повышение суммы эффективных температур в Средней полосе России позволяет выращивать южные сорта мяты не только для производства аптечного листа, но и для получения эфирного масла.

CHANGE IN PRODUCTION OF ESSENTIAL OIL BY MINT VARIETIES AND FORMS OF DIFFERENT GEOGRAPHIC ORIGIN INTRODUCED IN MIDDLE PART OF RUSSIA

Bidyukova G.F, Smirnova I.M., Olehnovich L.S., Enina O.L.

Institution of Russian Academy of Sciences main Botanical Garden named after N.V. Tsitsin RAS; Moscow, Russia
e-mail: lab-physiol@mail.ru

The essential oil produced by plants of genus *Mentha* L. is widely applied in medicine due to its own high bactericidal and antioxidant properties. These properties are mainly defined by presence of menthol, menthone and their derivatives.

Mint is used for chemist's leaf reception not only in southern regions and the Middle part of Russia, but also in a taiga zone. However, the sum of effective temperatures of vegetative period is necessary for mint use as an essential oil producer makes (is about) 3200 - 3400°C. For the Moscow region this indicator makes 2200-2300°C, but in last years the sum of effective temperatures has extremely increased and exceeded the average long-term on 664°C in 2009, and on 1211°C in abnormally hot in 2010. That's why we had analyzed biomass (leaves + inflorescences) accumulation and essential oil production in plants of the first year vegetation of mint varieties of different geographical origin. On the basis of prevailing major component in essential oil were defined the following types: mentholic, linaloolic and carvonic. In our experiment we used plants of mentholic type in which the content of menthol, menthone and derivatives makes more than 60% from all constituents of essence oil. Plants were grown on an experimental plot of MBG RAS. Experiments were spent in 2009 and 2010. On the plots 1m^2 cuttings with 3-4 pairs of developed leaves were planted ten varieties and forms. Five zoned varieties and one form of mentha peppery (*M. piperita* L.): Krasnodar 2, the zoned variety of the south of Russia; two varieties received from KEPU (Ukraine, Simferopol) – Udaychanka and Ukrainian peppery; two varieties received from VILAR (Russia, Moscow) - Muscovite, Medichka; form Mitchamsky; variety of the Vietnamese selection - NV-74; variety introduced in middle taiga zone, received from Institute biology Komy science center UrO RAS (Russia, Syktyvkar) - Kuban 6. Two forms of mint field (*M. arvensis* L.) – *M. arvensis var. pipiraceus* Holmes (Japanese mint) and from flora island Taiwan.

Biomass accumulation and essential oil production (per 1м^2) were defined in the end of budding – the flowering beginning phase. The extremely hot summer of 2010 had accelerated the beginning of this phase in the majority of varieties on 2-4 weeks in average, but in variety NV-74 and two forms of mint field (*M. arvensis* L.) there were no changes in terms of beginning of this phase.

Essential oil was received method of hydrodistillation. Results of analyses are presented in the table.

The name of a varieties, the form	2009		2010	
	Biomass, g/m^2	Essence oil, g/m^2	Biomass, g/m^2	Essence oil, g/m^2
Krasnodar 2	165.2	3.0	236.3	6.1
Kuban 6	559.8	11.1	352.5	10.8
Muscovite	366.8	10.9	355.1	12.4
Medichka	574.7	15.9	347.6	14.0
Udaychanka	390.7	10.7	382.5	18.0
Ukrainian peppery	251.1	7.0	302.6	13.0
Mitchamsky	478.9	7.6	302.1	10.0
NV-74	508.5	9.7	314.9	12.3
Japanese mint	200.2	3.1	202.3	5.2
Taiwan form, *M. arvensis*	139.0	2.5	226.8	6.0

It is necessary to notice, that at southern varieties and two forms of mint field the extremely high excess of the sum of effective temperatures over average long-term substantially has increased the essential oil production, but at varieties Muscovite, Medichka and Kuban 6 – practically hasn't changed.

Thus, increase of the sum of effective temperatures makes possible to cultivate southern varieties not only for chemist's leaf, but also for essential oil production in a middle part of Russia.

ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПРОДУКТИ ТА БІОПРЕПАРАТИ: НОВІ ПІДХОДИ

Бугина Л.М.

Ужгородский национальный университет, Ужгород, Украина
e-mail: nadiya.boyko@gmail.com

Вступ. Одним з досягнень кінця нашого століття є розробка принципово нової концепції "функціональне харчування", що торкається багатьох фундаментальних та прикладних аспектів медицини, нутриціології та біотехнології. Якість харчування тісно пов'язана з способом життя людини; тому частка населення ряду країн не одержує з їжею необхідної кількості вітамінів, мікро- і мікроелементів, поживних речовин. Частково вирішити дану проблему покликані так звані функціональні продукти (ФП), які принципово відрізняються від інших видів страв і напоїв, і за означенням мають здійснювати сприятливий (регулювальний) вплив на певні функції організму людини, або бодай зменшувати шляхом їх вживання ризик виникнення якого-небудь захворювання. При цьому важливою і неодмінною вимогою до ФП є незмінний (звичний) вигляд і смак цієї їжі (тобто її органолептичні властивості). Часто для збагачення ФП використовують нутрієнти, яких найбільше не вистачає в раціоні населення того чи іншого регіону. Для українців - це перш за все вітаміни С, А, групи В, йод, залізо, кальцій. Отже, ФП - це саме продукти харчування, їжа і напої (а не біологічно активні добавки (БАДи у вигляді порошків і таблеток), натурального або і штучного походження, що володіють приємним смаком і виразним оздоровчим ефектом, є зручними у використанні та призначені для щоденного систематичного застосування. По всьому світу, і Україна – не виняток, зростає зараз споживання ФП: хліб із муки грубого помолу із злаками, каша, збагачена вітамінами, мюслі з мінералами, сік з біоволокнами тощо. Це і продукти, що містять у своєму складі мікробіологічні субстанції – бактерії і мікроскопічні гриби, що є основою пробіотиків [1]. Чи здатні ФП приносити реальну користь нашому організму? Чи можна розглядати традиційні страви у якості ФП? Відповіді на ці та деякі інші питання будуть знайдені у процесі виконання РП7 проекту "BaSeFood".

Метою даного повідомлення є представлення результатів мікробіологічного обстеження основних рослинних компонентів страв і напоїв, що належать до традиційних продуктів харчування країн басейну Чорного моря як потенційного джерела корисних мікроорганізмів. З іншого боку в роботі наведено дані про здатність відібраних рослинних компонентів вибірково (по різному) впливати на ріст і розмноження мікроорганізмів, що умовно відносяться до патогенних, умовно-патогенних і не патогенних.

Матеріали та методи. Досліджено готові до вживання традиційні страви, зокрема: соус із червоних і зелених слив, олію льону, квашену капусту, сік кавуна, чай з тмину; ліофільно висушені екстракти узвару, зеленого борщу, помазанки; а також чисті екстракти (соки) рослин: кропиви, щавлю, моркви, буряка, кропу, петрушки, цибулі, часнику, помідор, капусти, гранату, яблук, груш, слив, перцю, огірка, дині, чорниць. Екстракти отримано шляхом подрібнення овочів, ягід і фруктів з наступним пропускання їх гомогенатів через нейлонові мікрофільтри (BD Falcon (44 мкм) з метою отримання стерильних зразків. Всі тестовані нами проби обстежено на виявлення в них корисних мікроорганізмів родів *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* за допомогою використання хромогенних поживних середовищ нового покоління. Дію вказаних екстрактів досліджено у динаміці протягом 24, 48 та 72 години культивування у них штамів *E. coli Шедлера, E. coli 058, Bacillus subtilis 090, B. subtilis 8031, B. subtilis 3, B. licheniformis 31, Lactobacillus salivarius, L. acidophilus, Saccharomyces boulardii*. Титр мікроорганізмів визначено шляхом висіву тест-мікроорганізмів із серійних розведень (1:1, 1:25, 1:125 і 1:625) екстрактів у фізіологічному розчині та бульйоні з на відповідні поживні середовища із забезпеченням усіх необхідних контролів (планшетний метод).

Результати досліджень. Ріст *Lactobacillus salivarius* стимулювали екстракти свіжої білокачанної капусти, дині та чаю з тмином, тоді як грузинські соуси здійснювали аналогічний вплив лише на штами бактерій роду *Bacillus*: *Bacillus subtilis 3* і *Bacillus licheniformis*, що є основою пробіотичного препарату Біоспорин. У той же час, соус із слив і ферментована традиційна страва - квашена капуста – характеризувались виразною здатністю інгібувати ріст деяких умовно-патогенних і патогенних бактерій, у тому числі Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), *Shigella sonnei, Salmonella enteritidis, Proteus mirabilis, Enterococcus faecalis*. Рослинний екстракт (сік) моркви пригнічував ріст *Enterobacter cloaceae*, а часнику - метицилін резистентного *Staphylococcus aureus (*MRSA) і *Pseudomonas aeruginosa* ATCC. Інші реєстровані ефекти є менш бажаними, але не менш важливими (пригнічення росту тестованих штамів лактобацил, ентерококів та інших представників коменсальної мікрофлори).

Висновки. Ретельний науковий аналіз традиційних страв країн регіону Чорного моря дозволить відібрати серед їх числа потенційні страви і напої, що можуть бути номіновані як ФП. Особливою умовою належності того чи іншого продукту до ФП є наявність підтверджених висновків ретельно і згідно вимог проведених клінічних випробувань [2].

Література:

1.*Fuller R.* Probiotics in man and animals: a review / R. Fuller // J. Appl. Bacteriol. – 1989. – V.66. – P. 365–378.
2.*Доронин А.Ф.* Функциональное питание / Доронин А.Ф., Шендеров Б.А. // М: Грантъ, - 2002. - с. 296.

FUNCTIONAL PRODUCTS AND BIOPREPARATIONS: NEW APPROACHES

Buhyna L.

Uzhhorod National University, Uzhhorod, Ukraine
e-mail: nadiya.boyko@gmail.com

Introduction. Development of a principally new concept of 'functional diet' having to do with a number of fundamental and applied aspects of medicine, nutricyology and biotechnology ranked high among the scientific achievements of the end of the 20th century. Quality of the people's diet is closely interdependent with their way of life; therefore in a number of the countries many people fail to receive the required amount of vitamins, micro- and macroelements and nutrients with their food. It is the so-called *functional products* (FP), principally different from other food and beverages, that are called forth to partially solve this problem; the FP by definition have to exert positive (regulating) effect upon some functions of the human organism; or at least their use is meant to reduce the risk of development of any disease. Taking this into consideration, it is also essential that the FP must not alter the food's customary appearance and taste (i.e. its organoleptic properties). To enrich the FP, often are applied the nutrients that are in want in the diet of the inhabitants of a given area. For the Ukrainians these primarily are the vitamins C, A, and B group, iodine, iron and calcium. That is why, the FP (not the biologically active additives in the form of powder and pills) are such natural or sometimes constructed food products and beverages that have both a pleasant taste and a curative effect, are handy and meant for the systematic everyday use. Consumption of the FP is presently growing globally, including in Ukraine. Among them, one can enumerate bread made of coarsely ground flour with crops, vitamin-enriched hot cereals, mueslis with minerals, juices with biofibres, etc., as well as the products with microbiological substances: bacteria and microscopic fungi as the basis for probiotics [1]. Are the FPs able to be really useful for our organism? Can the traditional food be treated as the FP? In the process of implementation of the *BaSeFood* project, we will seek to answer these and a number of other questions.

The purpose of this review is to represent the result of the microbiological study of main plant components of the food and beverages traditional in the countries of the Black Sea basin, as a potential source of useful microorganisms. On the other hand, we present data on the selected plant components' ability to affect (in a different way) the growth and reproduction of the microorganisms tentatively referred to as pathogenic, opportunistic pathogenic and non-pathogenic.

Materials and methods. The following ready-to-consume traditional dishes were studied: red and green plum dressing, linseed oil, sauerkraut, water-melon juice, cumin tea; lyophilized extracts of stewed dried fruit, sorrel soup, spreads; pure stinging nettle, sorrel, carrot, beetroot, dill, parsley, onion, garlic, tomato, cabbage, pomegranate, apple, pear, plum, pepper, cucumber, melon, and bilberry extracts (juices). The extracts were produced by crushing of the berries, fruit and vegetables with subsequent passing of the resulted homogenates through *BD Falcon* nylon microfilters (44 micrometers) to obtain sterile samples. All the tested samples were examined on the presence of useful microorganisms of *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Enterococcus* genera with the help of the use of new-generation chromogenic nutrient media. The activity of the said extracts was studied in dynamics on the 24, 48 and 72 hours of cultivation of *Shaedler's E. coli, E. coli 058, Bacillus subtilis 090, B. subtilis 8031, B. subtilis 3, B. licheniformis 31, Lactobacillus salivarius, L. acidophilus,* and *Saccharomyces boulardii* strains. The microorganisms' titre was determined by plating of the test-microorganisms from serial solutions (1:1, 1:25, 1:125 and 1:625) of the extracts in the saline and broth onto respective nutrient media with adherence to all the required controls (the flatbed method).

Results. Growth of *Lactobacillus salivarius* was stimulated by the extracts of fresh white cabbage, melon and cumin tea, whereas the traditional Georgian dressings similarly affected only the *Bacillus* strains, voz.: *Bacillus subtilis 3* and *Bacillus licheniformis*, the bases of the probiotic preparation *Biosporine*. At the same time, the plum dressing and sauerkraut (a traditional fermented food) were characterized by their expressed ability to inhibit the growth of certain opportunistic pathogenic and pathogenic bacteria, including Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), *Shigella sonnei, Salmonella enteritidis, Proteus mirabilis,* and *Enterococcus faecalis*. It was the cabbage extract (juice) that inhibited the growth of *Enterobacter cloaceae*, while the garlic extract acted similarly against the methicillin of resistant *Staphylococcus aureus (*MRSA) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC. The other registered effects proved less desirable, however not less important (inhibition of the growth of the tested strains of lactobacilli, enterococci and other representatives of the commensal microbiota).

Conclusions. A thorough scientific analysis of the traditional dishes of the countries of the Black Sea basin would make it possible to select the foods and beverages potentially able to be nominated as the FP. It is proved availability of the conclusions of decently run clinic tests that must be treated as a peculiar precondition of a product's referring to as an FP [2].

References:

1.*Fuller R.* Probiotics in man and animals: a review / R. Fuller // J. Appl. Bacteriol. – 1989. – V.66. – P. 365–378.
2.*Doronin A.F.* Funktsionalnoye pitaniye / Doronon A.F., Shenderov B.A. // Moscow: Grant. – 2002. P. 296.

БУРЫЕ ВОДОРОСЛИ – ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Вищук О.С.

Учреждение РАН Тихоокеанский институт биоорганической химии Дальневосточное отделение РАН,
Владивосток, Россия
e-mail: vishchuk87@gmail.com

Бурые водоросли морей Дальнего Востока представляют собой возобновляемый, легко культивируемый источник таких полисахаридов, как ламинараны, сульфатированные полисахариды – фукоиданы и альгиновые кислоты.

Фукоиданы, синтезируемые только морскими организмами, вызывают особый интерес, поскольку они отличаются разнообразием биологического действия. В настоящее время интенсивно исследуются антиоксидантные, антикоагулянтные, антивирусные, противоопухолевые и другие свойства фукоиданов [1].

Определение структуры фукоиданов водорослей является очень сложной задачей. С помощью химических и физико-химических методов анализа можно установить структуру лишь отдельных фрагментов молекулы, поскольку главные цепи фукоиданов могут быть разветвлены и лишены видимой регулярности. Также структурный анализ фукоиданов осложняется высокой степенью сульфатирования данных полисахаридов, присутствием в их составе кроме фукозы, других минорных моносахаридов и ацетильных групп [2], [3]. Поэтому неудивительно, что до сих пор невозможно оценить границы структурного разнообразия фукоиданов, выделяемых из бурых водорослей, и, следовательно, надежно связать проявление той или иной биологической активности с определенными структурными элементами фукоиданов.

Цель данной работы – выделение, определение структурных характеристик и изучение противоопухолевой активности, а также установление взаимосвязи между структурой и биологической активностью сульфатированных полисахаридов бурых водорослей Японского, Охотского и Южно-Китайского морей.

Работа была поддержана грантом Дальневосточного отделения РАН (11-III-B-360 05-361 075).

Литература:

1. *Li, B.; Lu, F., Wei, X.; Zhao, R.* Fucoidan: structure and bioactivity. Molecules. 2008. V. 13. P. 1671-95.
2. *Zvyagintseva, T., Shevchenko, N., Nazarenko, E. and et.al.* Water-soluble polysaccharides of some brown algae of the Russian Far-East. Structure and biological action of low-molecular mass polyuronans // J. Exp. Marine Biology and Ecology. 2003. V. 294. P.1-13.
3. *Berteau, O., Mulloy, B.* Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide // Glycobiology. 2003. V. 13. P. 29-40.

BROWN ALGAE ARE PERSPECTIVE SOURCES OF BIOLOGICAL ACTIVE POLYSACCHARIDES

Vishchuk O.S

The Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia
e-mail: vishchuk87@gmail.com

Recently, there has been increasing interest in the screening of bioactive compounds from natural sources such as marine organisms. Brown algae (Phaeophyta) are known to be not only very important resources as food, feed and energy, but they are also rich sources of structurally diverse polysaccharides with valuable biological activities.

Brown algae produce different polysaccharides, namely alginic acids, laminarans and sulfated polysaccharides (fucoidans). Fucoidans, are presented in brown algae and some invertebrates, attract much attention due to their numerous biological activities. In particular anticoagulant, antiviral, immunomodulating, anti-inflammatory and antitumor activities of fucoidans are investigated intensively. [1]

The structures of algal fucoidans are very complicated. The algal polysaccharides are usually heterogeneous and branched, they may contain additional monosaccharide constituents, acetyl groups, and the sulfation pattern is not regular. [2], [3] As a result, chemical methods of structural analysis, as well as NMR spectra of fucoidans, usually give only partial information on their structures. That is why the structural characteristics of fucoidans, responsible for biological activities, have not been determined and consequently the relationship between their structure and biological activities have not been clear established.

In present work we establish the structures of the fucoidans from brown algae of the Sea of Japan, the Sea of Okhotsk and the South China Sea, investigate their antitumor activity and to determine relationships between structure and antitumor activity of isolated fucoidans in the Pacific Institute of Bioorganic Chemistry Far Eastern Branch of Russia Academy of Sciences (Russia).

The work was supported FEB RAS grants (11-III-B-360 05-361 075).

References:

1. *Li, B.; Lu, F., Wei, X.; Zhao, R.* Fucoidan: structure and bioactivity. Molecules. 2008. V. 13. P. 1671-95.
2. *Zvyagintseva, T., Shevchenko, N., Nazarenko, E. and et.al.* Water-soluble polysaccharides of some brown algae of the Russian Far-East. Structure and biological action of low-molecular mass polyuronans // J. Exp. Marine Biology and Ecology. 2003. V. 294. P.1-13.
3. *Berteau, O., Mulloy, B.* Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide // Glycobiology. 2003. V. 13. P. 29-40.

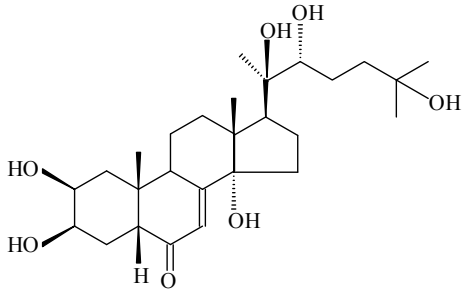
ЭКДИСТЕРОИДЫ РАСТЕНИЙ РОДА *SERRATULA L. GENUS*

Володина С.О., Пылина Я.И., Володин В.В.

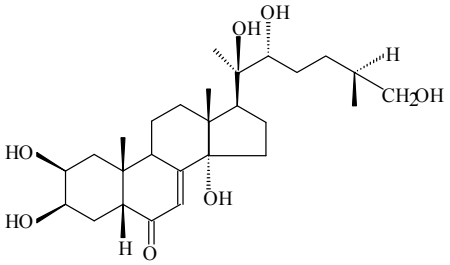
Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия
e-mail: volodin@ib.komisc.ru

Растения рода Serratula L. (Asteraceae Dumort.) являются источником ценных биологически активных веществ экдистероидов, для которых было показано анаболическое, актопротекторное, стресс-протекторное, иммуномодулирующее, противоишемическое, гиполипидемическое, противодиабетическое и радиопротекторное действия . *Serratula coronata* L. является одним из наиболее изученных видов растений среди представителей рода Serratula. Ранее было обнаружено, что в фазах бутонизации и цветения в листьях растения содержится максимальное количество 20-гидроксиэкдизона (20Е) **(1).** Кроме мажорного экдистероида 20Е, были обнаружены ряд структурно модифицированных минорных экдистероидов, таких как макистерон, инокостерон, аюгастрон С, макистерон С, дакрихайнанстерон и некоторые другие [1,2].

Изучение структурного разнообразия экдистероидов в других представителях рода Serratula является актуальным направлением современных исследований. Проведено сравнительное изучение качественного и количественного состава экдистероидов дикорастущих и культивируемых растений *S. inermis* Gilib., *S. quinquefolia* Bieb. ex Willd., *S. gmelinii* Tausch. and *S. radiata* Waldst. & Kit.. Было установлено, что по сравнению с дикорастущими растениями *S. quinquefolia*, произрастающими в горных лесах Северного Кавказа, в культурных растениях (в средне-таежной зоне Республики Коми) в качестве мажорного экдистероида содержится инокостерон **(2),** а не 20Е, что является адаптивной реакцией растения на изменение светового режима. Обнаруженный факт может иметь весьма важное практическое значение: *S. quinquefolia* при выращивании в среднетаежной зоне Республики Коми может служить источником весьма ценного экдистероида – инокостерона, для которого показана перспектива использования в качестве антиоксидантного и анаболического средства.



1



2

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Отделения биологических наук РАН (проект N09-Т-4-1002) и Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект N09-П-4-1013).

Литература:

1.*Lafont R., Dinan L.* Practical uses for ecdysteroids in mammals and human: an update // Insect.Sci., 2003. Vol.3, № 7. 30 p.
2.Фитоэкдистероиды / Под ред. В.В Володина Санкт-Петербург: Наука, - 2003. - 293 с.

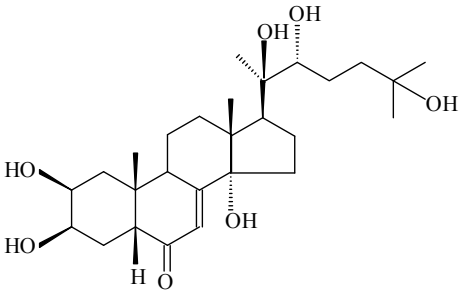
ECDYSTEROIDS OF SERRATULA *L. GENUS*

Volodina S.O., Pylina Y.I., Volodin V.V.

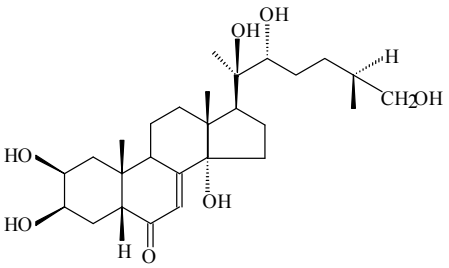
Institute of Biology of the Komi Sci Centre, Ural Branch, RAS, Syktyvkar, Russia
e-mail: volodin@ib.komisc.ru

Plants of Serratula L. genus (Asteraceae Dumort.) are source of the valuable biologically active substances such as ecdysteroids, for which anabolic, acto-protective, stress-protective, immunomodulatory, anti-ischemic, hypolipidemic, antidiabetic, and radioprotective action was shown. *Serratula coronata* L. is most investigated plant species among representatives of Serratula genus. Previously it was found that leaves of budding and flowering plants contain maximal amount of 20-hydroxyecdysone (20E) **(1)**. Besides 20E, major plant ecdysteroid, there were found a number of structurally modified minor ecdysteroids such as makisterone A, inokosterone (**2**), ajugasterone C, makisterone C, dacryhainansterone and some others [1,2].

The disclosure of structural diversity of ecdysteroids in other representatives of Serratula genus is urgent direction of modern studies. Comparative study of qualitative and quantitative composition of ecdysteroids in wild and cultivated plants *S. inermis* Gilib., *S. quinquefolia* Bieb. ex Willd., *S. gmelinii* Tausch. and *S. radiata* Waldst. & Kit. is carried out. It was found that in comparison with wild plants S. quinquefolia growing in the mountain forests of the North Caucasus in cultivated plants (middle taiga zone of the Republic of Komi) contain inokosterone as major ecdysteroid instead of 20E that reflects adaptive reaction of plants towards modified light regime. The fact discovered can have practical value for the obtaining of inokosterone for medicine due to its strong antioxidant and anabolic action by the cultivation of *S. quinquefolia* on the open plots under conditions of long light day in the North.



1



2

This study was carried out by Financial Support by the Program of Division of Biological Sciences of RAS (project N 09-T-4-1002) and the Program of Presidium of RAS "Fundamental sciences to medicine" (project N09-П-4-1013).

References:

1.*Lafont R., Dinan L.* Practical uses for ecdysteroids in mammals and human: an update // Insect.Sci., 2003. Vol.3, № 7. 30 p.
2.Phytoecdysteroids / Ed. by Volodin V.V., Saint-Petersburg: Nauka, - 2003. - 293 p. (in Russia).

ЭКДИСТЕРОИДСОДЕРЖАЩИЕ РАСТЕНИЯ И КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ – ИСТОЧНИКИ НОВЫХ АДАПТОГЕННЫХ СРЕДСТВ

Володина С.О., Володин В.В.

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия
e-mail: volodin@ib.komisc.ru

В связи с необходимостью разработки новых лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище адаптогенного действия большой интерес представляют фитоэкдистероиды – полигидроксилированные стерины, структурно идентичные или близкие гормонам линьки членистоногих, для которых показан широкий спектр физиологической активности, малая токсичность и отсутствие гормонального действия у млекопитающих. Нами разработана методология скрининга растений на содержание фитоэкдистероидов и установлены закономерности их распространения среди сосудистых растений. Выявлены перспективные виды в отделах папоротникообразных и покрытосеменных растений из географически удаленных флор (европейский северо-восток России, Урал, Северный Кавказ, Украина, Дальний Восток). Установлен состав и динамика содержания экдистероидов в ряде перспективных видов дикорастущих и культивируемых растений родов *Rhaponticum (R. carthamopides, R. serratuloides), Serratula (S. coronata, S. tinktoria, S. quinquefolia, S. radiata, S. gmelini), Silene (S. tatarica, S. repens), Chenopodium (Ch. bonus-henricus)* и др. Разработаны методы микроклонального размножения некоторых видов экдистероидсодержащих растений. Получены высокопродуктивные штаммы каллусных и суспензионных культур растительных клеток – продуценты экдистероидов. Разработана технология получения экдистероидсодержащей субстанции Серпистен из надземной части растений *Serratula coronata.* Результаты доклинических исследований показали выраженное противоишемическое, гиполипидемическое, антидиабетическое, противолучевое и актопротекторное действие. На ее основе разработаны три капсулированные формы БАД (Кардистен – противоишемического, Диастен – противодиабетического и Адастен – иммуностимулирующего действия), которые рекомендованы для использования в гериатрии и восстановительной медицине.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Отделения биологических наук РАН (проект N09-Т-4-1002) и Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект N09-П-4-1013).

ECDYSTEROID-CONTAINING PLANTS AND CELL CULTURES AS SOURSES OF NEW ADAPTOGENIC REMEDIES

Volodina S.O., Volodin V.V.

Institute of biology of the Komi Sci Centre, Ural Division, Russian Academy of Science, Syktyvkar, Russia
e-mail: volodin@ib.komisc.ru

At present phytoedysteroids that are structurally relative to insect moulting hormones attract attention for the development of the new effective and safe adaptogenic medicinal preparations and nutritional supplements since these compounds do not have any toxic and negative hormonal effects on mammals. We developed the methodology of the screening of plants for the ecdysteroids presence. A number of perspective plant species with high ecdysteroids content are revealed among ferns and angiosperms from the geographically remote flora (European northeast of Russia, the Urals, the North Caucasus, the Ukraine, the Far East, etc). The composition and dynamics of ecdysteroids in a number of wild and cultivated plants of the genera of *Rhaponticum (R. carthamoides, R. serratuloides*), *Serratula (S. coronata, S. tinktoria, S. quinquefolia, S. radiata, S. gmelini), Silene (S. tatarica, S. repens), Chenopodium (Ch. bonus-henricus)* are studied. The method of the micro-clonal propagation of some ecdysteroid-containing species. The highly productive strains of the callus and suspension cultures of plant cells – ecdysteroids producers are obtained. The technology of obtaining the ecdysteroid-containing substance Serpisten from the overground part of *Serratula coronata* is developed. The results of preclinical studies showed the strongly pronounced anti-ischemic, hypolipidemic, anti-diabetic, anti-ray and actoprotective effects. On its basis three encapsulated forms of nutritional supplements (Kardisten with anti-ischemic and cardio-protective), Diasten with anti-diabetic and Adasten with immune-stimulating action) are developed and recommended for the use in geriatry and restorative medicine.

This study was carried out by Financial Support by the Program of Division of Biological Sciences of RAS (project N 09-T-4-1002) and the Program of Presidium of RAS "Fundamental sciences to medicine" (project N09-П-4-1013).

РАСТЕНИЯ ЮЖНОЙ ЯКУТИИ КАК ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Зайцева Н.В., Погуляева И.А.

Технический институт (филиал) ФГАОУ ВПО
«Северо-восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова» в г. Нерюнгри,
Республика Саха (Якутия), Россия.
e-mail: nz_demetra@mail.ru

Южная Якутия, благодаря особенностям своего географического положения, относится к регионам, с климатическими условиями, которые можно охарактеризовать как неблагоприятные для произрастания растений. К таким неблагоприятным факторам можно отнести: очень короткий вегетационный период; дефицит тепловых ресурсов воздуха и почвы; большую разность между температурами дня и ночи; поздние весенние и ранние осенние заморозки (заморозки возможны в течение всего вегетационного периода); особенности гидротермического режима мерзлотных почв; низкое содержание в мерзлотных почвах питательных веществ. Свой вклад вносит и фактор высокогорья. Тем не менее, флора Южной Якутии представлена большим количеством видов растений, которые обладают устойчивостью и высокой экологической пластичностью за счет имеющихся механизмов адаптации, затрагивающих различные проявления жизнедеятельности растения.

Цель данного исследования – установить особенности химического состава растений, произрастающих в Южной Якутии с тем, чтобы выявить факторы их устойчивости на уровне синтеза биологически активных веществ.

Посредством качественных реакций и тонкослойной хроматографии нами были исследованы 150 видов растений видов местной флоры, принадлежащих 27 семействам, на предмет содержания флавоноидов, антоцианов, сапонинов, фенольных веществ. Отбирали растения наиболее широко представленных семейств с учетом фазы развития и условий существования.

Анализ показывает, что в растениях, хорошо приспособленных к условиям Южной Якутии, содержится большое количество флавоноидов, фенольных и дубильных веществ различных групп: все изученные растения дают соответствующие качественные реакции с гидроксидом натрия, хлоридом алюминия и уксуснокислым свинцом. Мы предполагаем, что эти вещества являются факторами устойчивости растений к чрезмерной солнечной инсоляции (с высокой долей УФ лучей). Подтверждением этому являются и результаты анализа экстрактов методом тонкослойной хроматографии: экстракты растений, выросших на открытых солнечных местах (луга, опушки, пустыри), а так же на склонах сопок с южной и западной экспозицией и в условиях высокогорья (гольцы) содержат намного больше веществ, обладающих свойством флюоресценции. Это свидетельствует о наличии в них механизмов защиты от интенсивного освещения, а так же того, что солнечное освещение в ясную погоду в данной местности становится фактором риска, вызывающего соответствующие приспособительные реакции.

Содержание стероидных гликозидов, даже в представителях семейства гвоздичные, не велико и, как правило, эти вещества представлены неактивными соединениями. Они обнаруживаются в экстрактах только после ферментации через 2-3 дня их настаивания.

Довольно широко представлены катехины (негидролизируемые дубильные вещества) и антоцианиды. Особенно богаты ими представители семейств вересковые, грушанковые, крыжовниковые, розовые. Высокое содержание антоцианов и их производных так же трактуется как приспособительная реакция к неблагоприятным условиям, т.к. антоцианы: 1) являются участниками фотопротекторных и антиоксидантных систем, чем объясняется накопление красных пигментов у высокогорных растений; 2) выполняют функции вспомогательных пигментов при фотосинтезе (антоцианы и катехины в больших количествах обнаружены нами в растениях, выросших в тени, или под пологом леса); 3) способствуют превращению световой энергии в тепловую, тем самым создавая благоприятные температурные условия для развития растения и выполнения ими биохимических и физиологических функций (многие зимующие под снегом растения, особенно среди представителей семейств вересковые, грушанковые, а также растения земляники, одуванчиков, змееголовника, начинающие вегетацию в очень ранние сроки, в своих листьях содержат преимущественно антоцианы, отчего эти листья выглядят бурыми, красными или бордовыми).

Так же во всех изученных нами растениях обнаружены в довольно высоких концентрациях дубильные вещества, которые выполняют самые разнообразные функции в растительном организме (например, усиливают дыхательные и фотосинтетические системы в клетках растения; выступают в роли антиоксидантов, антидотов, протекторов; являются фондом биологически активных веществ в инактивированном состоянии).

Если анализировать содержание тех или иных БАВ в зависимости от принадлежности к сообществам определенного типа, то было установлено, что в растениях луговых сообществ содержится большое количество флавоноидов (желтых пигментов) – как способ адаптации к повышенной солнечной инсоляции; в растениях каменистых склонов – флавоноиды и антоцианы (как способ регулирования температурных условий и усиления фотопротекторных свойств); в лесных растениях – катехины (вспомогательные фотосинтетические пигменты).

Работа выполнена в рамках АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2011 гг.)», рег. № 2.1.1/4949

THE PLANTS OF SOUTHERN YAKUTIA AS THE SOURCE OF BIOLOGICALLY - ACTIVE SUBSTANCES

Zayceva N.V., Poguliaeva I.A.

Technical institute (branch) of North-east federal university named after M.K.Ammosov in Nerjungri,
Republic Sakha (Yakutia), Russia.
e-mail: nz_demetra@mail.ru

The peculiarities of the geographical position of Southern Yakutia characterize the area as the region with unfavourable conditions for plants' growth. The conditions include: rather short vegetative period; lack of thermal sources of air and soil; significant difference between day's and night's temperatures; late vernal and early summer frosts (the frosts are possible during the whole vegetative period); the peculiarities of hydrothermal regime of frozen soils and low quantity of nourishing components in the soils. The fact of highlands also plays an important role. Therefore, the fauna of Southern Yakutia is presented with big number of various plants, which have special mechanisms for adaptation and strengthening resistance and high ecological flexibility.

The purpose of our research is to distinguish the peculiarities of the chemical composition of the plants, growing in the region, in order to find out the factors of their resistance on the layer of biologically – active substances' synthesis.

We have considered 150 sorts of the plants (the plants belong to 27 families) of the local area, using two methods: qualitative reactions and chromatography.

The plants, which we have selected, belong to the most widely presented families; also we took into account a phase of development and living conditions.

The analysis shows that the plants well adapted for conditions of Southern Yakutia contain the considerable quantity of flavonoids, phenolic and tannins of various groups: all of the studied plants give corresponding qualitative reactions with hydroxide of sodium, chloride of aluminium and acetic lead. We suppose that these substances are factors of stability of plants to excessive solar insolation (with high share of ultra – violet beams). To prove our opinion, it's necessary to mention that there are also results of the analysis of extracts by method of thin layer chromatography: extracts of the plants which have grown on open solar places (meadows, edges, waste grounds) as well as on slopes of hills with a southern and western exposition and in the conditions of high mountains contain much more substances possessing property of fluorescence. It testifies the presence of mechanisms of protection against intensive illumination, and as that solar illumination in a fair weather in the given district becomes a risk factor, causing corresponding adaptive reactions.

The quantity of steroid glycosides, even in the representatives of the clove family, is not great and, as a rule, these substances are presented by inactive connections. They are found out in the extracts only after fermentation in 2-3 days of their infusion.

Catechols (unhydrolised tannins) and anthocyanids are widely presented. The representatives of heath, dollar-leaf, grossularia, rose families are especially rich with them. The high maintenance of anthocyans and their derivatives also is understood as an adaptive reaction to adverse conditions, since anthocyans are: 1) participants of фотопротекторных and antioxidant systems, this fact is proved by accumulation of red pigments at high-mountainous plants; 2) carry out functions of auxiliary pigments at photosynthesis (anthocyans and catechols in considerable quantities are found out by us in the plants which have grown in a shade, or under wood bed curtains); 3) promote transformation of light energy in thermal, thereby creating favorable temperature conditions for development of plants and carrying out their biochemical and physiological functions (many plants wintering under snow, especially some representatives of families as heath and dollar-leaf, and also plants of wild strawberry, dandelions, gragonhead, beginning vegetation in rather early terms, contain mainly anthocyans in their leaves, that is why these leaves look brown, red or claret).

Moreover in all of the studied plants, we have found a big concentration of tannins which carry out the diversified functions in a vegetative organism (for example they strengthen respiratory and photosynthetic systems in plant cages; act in a role of antioxidants, antipillboxes, protectors; represent a fund of biologically active substances in an inactivate state.

If analyze the maintenance of BAS depending on an accessory to families of certain type it has been established that the plants of meadow families contain the considerable quantity of flavonoids (yellow pigments) – as a way of adaptation to raised solar insolation; in plants of stony slopes – flavonoids and anthocyans (as a way of regulation of temperature conditions and strengthening of photoprotector properties); in wood plants – catechols (auxiliary photosynthetic pigments).

Work is executed within the limits of the analytical departmental target program «Development of scientific potential of the higher school (2009-2011)», registration № 2.1.1/4949

КАРПОМАССА ЧЕРНОПЛОДНОЙ РЯБИНЫ *IN VITRO* – НОВЫЙ ИСТОЧНИК СЫРЬЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ

[1]Калалб Т.И., [2]Бежан Н.А.

[1] Государственный Университет Медицины и Фармации «Н.Тестемицану», Кишинэу, Молдова
e-mail: tatianacalalb@yahoo.com
[2] Институт Генетики и Физиологии Растений Академии Наук Молдовы, Кишинэу, Молдова
e-mail: corlateanu57@yahoo.com

Плоды черноплодной рябины, названные в последнее время *суперфруктами,* благодаря богатому содержанию витаминов (P, K, C, E, B_1, B_2, B_6 и бета-каротин), микро- и макроэлементов (йод, марганец, фтор, бор, молибден, железо, медь), фенольных соединений (ФС) (флавоноиды, фенолокислоты, дубильные вещества), углеводов (пектиновые вещества, клетчатка, сахара) и других полезных веществ, обладают различными фармакологическими свойствами: иммуноукрепляющее, сосудоукрепляющее, гипотензивное, противовоспалительное, антимикробное, противовирусное, антиокислительное, тонизирующее, антиаллергенное, желчегонное, мочегонное и другие. В последнее время плоды аронии имеют большой спрос на мировом рынке как продукт здоровой пищи, богатой антиоксидантами, благодаря высокому содержанию ФС, но, к сожалению, не всегда возможно удовлетворить спрос естественными посадками.

Поэтому были проведены экспериментальные биотехнологические работы с целью определения биологических параметров (тип карпогистогена, возраст плода-донора для эксплантa, расположение эксплантa по отношению к субстрату), физических (температура, качество и продолжительность света) и химических (тип основной питательной среды, тип, дозы и соотношения фитогормонов в качестве добавок) для инициации и накоплении фруктовой биомассы (карпомассы) *in vitro* из плодов аронии [1]. В результате скрининга многочисленных экспериментов были определены оптимальные условия для инициации и аккумуляции карпомасс *in vitro* и определены вектор-факторы для получения карпомассы, обогащённой ФС [2]. Для структурного (морфологического, клеточного и субклеточного уровней) и фитохимического анализа были выбраны 4 пигментированные карпомассы, полученные на основной питательной среде Мурашиге и Скуг (1962) с различными модиффикациями: фиолетовая (2,5-3,5 мг/л НУК и 0,5 мг/л К), розово-кремовая (4,0-5,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л К), кремово-белая (1,0-2,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л К) на красном участке светового спектра, при температуре 22-24°C, зеленая (при добавлении 2,0-2,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л К) при естественном световом режиме и температуре 22-24°C [2,3]. Пигментированные карпомассы были изучены на морфологическом, клеточном и субклеточном уровнях [1,3], а также были получены водно-спиртовые вытяжки из этих пигментированных карпомасс *in vitro* и произведены качественные и количественные фитохимические исследования ФС в сравнении с плодами *in vivo* различными методами: спектрофотометрическими, титриметрическими, ТСХ, ВЭЖХ.

Таблица 1. Содержание различных химических соединений фенольной природы в плодах *in vivo* и карпомассах *in vitro* черноплодной рябины *A. melanocarpa* (Michx.) Elliot

Химическое вещество	Образцы для фитохимического анализа				
	Плоды *in vivo*	Фиолетовая карпомасса	Кремово-розовая карпомасса	Кремово-белая карпомасса	Зеленая карпомасса
Флавоноиды мг %	0,478±0,003	0,483±0,001	0,430±0,009	0,401±0,015	0,230±0,023
Антоцианы мг/100 г	818,3±18,2	680,5±12,4	540,9±10,1	430,6±10,3	401,6±10,1
Фенилпропановые соединения мг %	0,178±0,001	0,375±0,008	0,341±0,011	0,295±0,014	0,235±0,021
Дубильные вещества %	7,7±0,1	11,3±0,3	9,2±0,1	4,7±0,6	2,6±0,4
Сумма полифенолов мг/кг	63123±1153	65 570±800	52 910±720	51 170±400	36 780±880

Результаты, представленые в таблице 1, демострируют, что культивируемые *in vitro* клетки сочных плодов аронии сохранили биосинтетическую способность различных групп ФС. Количество ФС коррелирует с пигментацией карпомасс, определенным химическим составом питательной среды и качеством света. Фиолетовая карпомасса является более обогащенной ФС в сравнении с другими пигментированными карпомассами. Содержание общего количества ФС в карпомассах, за исключением антоцианов, даже более, чем в плодах *in vivo*. Таким образом, карпокультура аронии можеть послужить в качестве модели для создания биотехнологической схемы регулируемого производства биомасс *in vitro* как альтернативного источника сырья для получения биологически активных веществ фенольной природы для нужд пищевой, фармацевтической, косметической и ликеро-водочной промышленности.

Литература:

1. *T. Calalb. Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot (structura, biochimia şi biotehnologia fructelor). Chişinău: dPrim, 2010, 156 p.
2. *T. Calalb, A.Jacotă, Ню Bujoreanu, E.Chirilova, N. Bejan* // Патент на изобретение 83MD. Procedeu de obţinere *in vitro* a biomasei de fructe de *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot. // data de depozit 26.03.2009, BOPI nr 9/2009.
3. *T. Calalb* //The dynamic of structure modifications and phenolic acumulation in carpoculture of *Aronia melanocarpa* Elliot *in vitro* - Archives of the Balkan Medical Union, 2008, vol. 43, nr 3, p.326-328.

CHOKEBERRY CARPOMASS *IN VITRO* – THE NEW SOURCE OF RAW MATERIALS FOR PHENOLIC BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

[1]Calalb T., [2]Bejan N.

[1]State Medical and Pharmaceutical University "Nicolae Testemitanu", Chisinau, R. Moldova
e-mail: tatianacalalb@yahoo.com;
[2] Institute of Genetics and Plant Physiology of the Academy of Sciences, Chisinau, R. Moldova
e-mail: corlateanu57@yahoo.com

The chokeberry fruits, called superfruits recently, because of the rich content of vitamins (P, C, K, E, B_1, B_2, B_6 and beta-carotene), micro- and macroelements (iodine, manganese, fluoride, boron, molybdenum, iron, copper), phenolic compounds (PhC) (flavonoids, phenolic acids, tannins), carbohydrates (pectin, cellulose, sugar) and other nutrients possess different pharmacological properties: immunostimulent, strengthens blood vessels, hipotensive, antimicrobial, -viral, -inflammatory, -allergenic, antioxidant, tonic, choleretic, diuretic and other.

In recent years, the fruits of chokeberry are very asked in the world market as a product of a healthy antioxidant food due to high content of PhC, but unfortunately it is not always possible to give natural products.

That's why there were carried out experimental biotechnological works to determinate the biological parameters (type of carpohystogene, age of donor-fruit to explant, explant position relative to nutritive substrate), physical (temperature, quality and duration of light) and chemical (a type of basic culture medium, type, dose and the ratio of phytohormones as additives) for the initiation and accumulation of fruit biomass (carpomass) *in vitro* from the fruit of *A.melanocarpa* (Michx.) Elliot [1]. As a result, screening of numerous observations and the results, were determinated the optimal conditions for the initiation and accumulation of carpomasses *in vitro* and were determined the vector factors to received the carpomasses, riched in PhC [2]. For structural (morphological, cellular and subcellular levels) and phytochemical analysis were chosen four pigmented carpomasses obtained on the nutritive medium Murashige and Skoog (1962) with different modifications: violet (2,5-3,5 mg/l NAA and 0, 5 mg/l K), pink-cream (4,0-5,0 mg/l NAA and 0,5 mg / l K), white-cream (1,0-2,0 mg/l NAA and 0,5 mg/l K) under the red part of the light spectrum, temperature 22-24°C, and green (when added 2,0-2,5 mg/l of 2,4-D and 0,5 mg/l K) under the natural light regime and temperature of 22-24°C [2,3]. Pigmented carpomasses were studied at the morphological, cellular and subcellular levels [1,3], and also the qualitative and quantitative phytochemical analyses of PhC in aqueous-alcoholic extracts of the pigmented carpomasses *in vitro* were studied in comparison with fruits *in vivo* by different methods: spectrophotometric, titrimetric, TLC, HPLC.

Table 1. The content of various phenolic compounds in the fruits *in vivo* and in carpomasses *in vitro* of chokeberry *A. melanocarpa* (Michx.) Elliot

Chemical compound	Samples for phytochemical analysis				
	Fruits *in vivo*	Violet carpomass	Pink-cream carpomass	White-cream carpomass	Green carpomass
Flavonoids mg%	0,478±0,003	0,483±0,001	0,430±0,009	0,401±0,015	0,230±0,023
Anthocyanins mg/100g	818,3±18,2	680,5±12,4	540,9±10,1	430,6±10,3	401,6±10,1
Fenilpropanic acids mg%	0,178±0,001	0,375±0,008	0,341±0,011	0,295±0,014	0,235±0,021
Tannins %	7,7±0,1	11,3±0,3	9,2±0,1	4,7±0,6	2,6±0,4
The total polyphenols mg/kg	63123±1153	65 570±800	2 910±720	51 170±400	36 780±880

The phytochemical results presented in table 1 demonstrate that cells of fleshy chokeberry fruits cultured *in vitro* retain biosynthetic capacity of different groups of PhC, characteristic for fruit *in vivo*. Content of PhC correlates with pigmentation of carpomasses *in vitro*, determinated by additional chemical composition of nutritive culture medium and quality of light. Violet carpomass is riched in PhC in comparison with other pigmented carpomasses. Content of all PhC, the exception only anthocyanins, even more in violet and pink-cream pigmented carpomasses than in the chokeberry fruits *in vivo*. Thus, chokeberry carpoculture may serve as a model of the biotechnological scheme for manipulating produce of fruit biomass *in vitro* as a source of alternative raw material for production of biologically active substances of phenolic nature for alimentary, pharmaceutical, cosmetic and alcoholic drinks industries.

References:

1. *T. Calalb Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot (structura, biochimia şi biotehnologia fructelor). Chişinău: dPrim, 2010, 156 p.
2. *T. Calalb, A.Jacotă, Nю Bujoreanu, E.Chirilova, N. Bejan* // Патент на изобретение 83MD. Procedeu de obţinere *in vitro* a biomasei de fructe de *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot. // data de depozit 26.03.2009, BOPI nr 9/2009.
3. *T. Calalb* //The dynamic of structure modifications and phenolic acumulation in carpoculture of *Aronia melanocarpa* Elliot *in vitro* - Archives of the Balkan Medical Union, 2008, vol. 43, nr 3, p.326-328.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ, С СОХРАНЕНИЕМ НАТИВНЫХ СВОЙСТВ ИСХОДНОГО СЫРЬЯ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВЕРХКРИТИЧЕСКИХ CO_2-ФЛЮИДОВ

[1]Каражия В., [1]Николаева Д., [1]Подогова М., [2]Симак В., [3]Чокырлан А., [4]Головко Ю.

[1]Научно-практический институт садоводства, виноградарства и пищевых технологий, Лаборатория технологии пищевых продуктов, Кишинев, Республика Молдова, e- mail: ltpa_caragia@mail.ru , d.nikolaeva@mail.ru
[2]Institutul de Bioresurse Alimentare, Bucuresti, Romania, e-mail:viorel.simac@bioresurse.ro
[3] Институт химии АН Молдовы, Кишинев, Республика Молдова e- mail: algciocarlan@excite.com
[4]"SVD –GRUP" SRL, Кишинев, Республика Молдова, www.ecoextract.com, e- mail: info@ecoextract.com

Технология извлечения из растительного и животного сырья биологически активных веществ с использованием в качестве экологически чистых и безопасных растворителей сверхкритических CO_2 - флюидов (СК-СО2), приобретают в настоящее время не только статус лабораторного инструмента изучения химического состава растительного и животного сырья, но и распространяются как промышленный метод, позволяющий получать из натурального сырья экстракты в целом и отдельные фракции (вплоть до получения целевых биологически активных компонентов) для фармацевтической, косметологической и пищевой промышленности [1,2].

Предлагаемая нами технология получения биологически активных экстрактов с помощью СК-CO_2 предполагает высокую экологичность процесса, поскольку углекислый газ как растворитель исключает возможность загрязнения окружающей среды и конечной продукции. Более того, данная технология позволяет получать высококонцентрированные экстракты без остатков какого бы то ни было растворителя с сохраненным составом биологически активных веществ в их нативном соотношении, не содержащие остатков органических растворителей и их примесей. Сохранность биологически активных компонентов обеспечивается достаточно низкой (не более 40°С) температурой процесса. Кроме того, применение в качестве растворителя CO_2 при повышенном давлении обеспечивает микробиологическую чистоту готовой продукции.

Наш подход к разработке технологии заключался в изучении параметров процесса извлечения биологически активных веществ (фитокомпонентов): давление, температура, расход растворителя, продолжительность процесса CO_2 суперкритической экстракции; в оценке влияния этих параметров на процесс экстракции и содержание в экстрактах биологически активных веществ (токоферолов, витамина А, незаменимых жирных кислот), с попыткой разработки кинетической модели экстракции для дальнейшего установления оптимальных режимов извлечения ценных компонентов для каждого из видов сырья

Экспериментальные работы проведены с использованием сырья - зародышей пшеницы (выращенной в Республике Молдова и Румынии).

Исследование процесса экстракции выполнялось на лабораторной пилотной установке сверхкритической флюидной CO_2 экстракции, снабженной 1000см^3 экстракционной емкостью и двумя емкостями сепараторами на 600см^3 каждая, смонтированными последовательно, с компьютерным обеспечением данного процесса.

Анализ жирнокислотного состава в виде метиловых эфиров проведен через трансэстерификацию проб экстрактов на хроматографе Hawlett -Packard HP-6890 с капиллярной колонкой HP -23.

Экстракция зародышей пшеницы проведена при 37-42º С и давлении 35 -40MPa в экстракторе с выделением экстракта при параметрах : в первом сепараторе при 45ºС , давлении 14–17MPa и при 35ºС, давлении 6,5–7,0MPa во втором сепараторе. Оптимальная продолжительность экстракции 60 мин, обьем прохождения экстрагента 35кг на 1кг сырья.

Проведена оценка качества концентрированных экстрактов из зародышей пшеницы и содержания биологически активных веществ (токоферолов и витамина А), исследован состав жирных кислот в полученных экстрактах для дальнейшего обоснования и стандартизации показателей качества.

Содержание витаминов группы Е (α-, γ-, ω- токоферолы) в зависимости от примененного режима колеблется: α - токоферол от 76,16 до 123,6; γ - токоферол от 43,86 до 67,55; сумма токоферолов от 120,02 до 191,15 мг/100г экстракта. Содержание извлеченного при этих же параметрах витамина А в образцах составило 2900-3300 МЕ на 1г экстракта.

Экстракты содержат в основном биологически активные эссенциальные полиненасыщенные жирные кислоты, которые составляют 64,74% от общего экстракта (линолевая 18:2 (омега-6), α - линоленовая 18:3 (омега-3), что позволяет использовать экстракт в качестве биологически активной добавки для создания здоровой пищи, а возможно и для создания природного фармацевтического препарата АЕвит [3].

Работы проводятся при финансовой поддержке академии Наук Р.Молдова в сотрудничестве с исследовательским институтом Румынии по совместному проекту № 24/RoA.

Мы открыты для сотрудничества с заинтересованными партнерами для апробации использования CO_2-экстрактов. Предполагаем создать банк данных по CO_2-сверхкритическим экстрактам эндемической флоры Причерноморского региона (производство, биохимическая и клиническая оценка, применяемость).

Литература:

1. *E. Reverchon, C. Marrone* Modeling and simulation of the supercritical CO_2 extraction of vegetable oils. J. Supercrit. Fluid. 2001, 19,161-175.
2. *Q. Lang, C. M. Wai* Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies-a practical review, Talanta 2001, 53, 771 -782
3. *А.Б. Вишняков, В.Н. Власов и др.//* Масло зародышей пшеницы – мощный природный стимулятор иммунной системы. ООО "Пулат", Парафармацевтика 2004, №3, с.14-16.

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY, THE JUSTIFICATION OF QUALITY INDICATORS OF SUPERCRITICAL CO2 EXTRACTS, OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES (PHITOCOMPONENTS), FROM NATURAL PLANT RAW MATERIALS

[1]Caragia V., [1]Nicolaeva D.,[1]Podogova M., [2]Simac V., [3]Ciocarlan A., [4]Golovco Ju.

[1] Intitution Scientific-Practical Institute of Horticulture, Viticulture and Food Tenology, Laboratory of Food Technology, Chisinau, Moldova, e- mail: ltpa_caragia@mail.ru[2] Institutul de Bioresurse Alimentare, Bucuresti, Romania. e- mail: viorel.simac@bioresurse.ro
[3] Institute of of Chemistry, Academy of Sciences of Moldova, Chisinau, Moldova e-mail: algciocarlan@excite.com
[4] "SVD-GROUP" SRL, Chisinau, Moldova, e- mail: info@ecoextract.com

Technology of extraction of herbal bioactive substances using as a clean and safe solvent, supercritical (SC) carbon dioxide (CO_2) allows us to obtain, from natural raw materials, highly concentrated extracts in their natural ratio and individual fractions up to the task of obtaining biologically active components for the pharmaceutical cosmetic and food industries [1, 2].

Our proposed technology for producing biologically active extracts by SC-CO_2 assumes a high ecological process, since carbon dioxide as a solvent, eliminates the possibility of environmental contamination and the contamination of final product. Moreover, this technology allows to obtain highly concentrated extracts without of residues of any kind of the solvent and saving the biologically active substances in their native proportions. Preservation of biologically active ingredients ensures of a sufficiently low (less than 40 º C) process temperature. Furthermore, the use of CO_2 as a solvent at high pressure provides the microbiological purity of the finished product.

Our approach to technology development was to study the parameters of the extraction of biologically active substances (phytocomponents): pressure, temperature, solvent consumption, the duration of the supercritical CO2 extracts; to assess the impact of these parameters on the extraction process and content in the extracts of biologically active compounds (tocoferols, vitamin A, essential fatty acids), with an attempt to develop a kinetic model for the further extraction and establishing optimum conditions of extraction of valuable components for each of the plant materials.

The experimental work was carried out using raw materials - wheat germ, (grown in Moldova and Romania). Supercritical CO2 extractions were performed in a laboratory pilot plant equipped with a 1000 cm^3 extraction vessel and the two separator vessels of 600 cm^3 each, respectively connected in series, with computer software in the process.

Analysis of fatty acid composition in the form of methyl esters via trans esterification was carried out on extracts chromatograph Hawlett-Packard HP-6890 capillary column HP c -23.

Extraction of wheat germ carried out at 37-42 º C and pressure of 35 -40 MPa in the extractor, with separation of the extract with the parameters: in the first separator at 45 º C and pressure of 14 - 17MPa and at 35 º C, pressure 6,5 - 7,0 MPa in second separator. The optimal duration of extraction was 60 min, the volume passing the extractant - 35 kg on 0.5 kg of raw material.In the development of the parameters evaluated the quality of concentrated extracts of wheat germ and content of biologically active compounds (tocoferols and vitamin A), composition of fatty acids in the extract for further justification and standardization of quality indicators.

The content of vitamin E (α-γ- δ -tocoferol), depending on the application of the regime ranges: α-tocoferol from 76.16 to 123,6; γ-tocoferol from 43.86 to 67.55, the sum amount of tocoferols from 120.02 to 191.15 mg / 100 g of extract.

Contents of vitamin A, extracted under the same parameters i in extracts of the samples were 2900– 3300 IU /1g . Extracts contain mainly bioactive essential polyunsaturated fatty acids, which make up to 64.74% of the total extract (linoleic 18:2 (omega-6), α-linolenic 18:3 (omega-3), which allows you to use the extract as a dietary supplement for a healthy food, and possibly to create a natural pharmaceuticals AEvit [3].

This work was supported by Academy of Sciences of the Republic of Moldova in cooperation with Research Institute in Romania (project № 24/RoA).

We are open for cooperation with research institutes in Russia and Ukraine to the approbation of CO_2 extracts. Proposes to establish a data bank of supercritical CO2 extracts of the endemic flora of the Black Sea region (manufacturing, biochemical and clinical assessment of the applicability).

References:

1. *Reverchon,E.; Marrone,C.* //Modeling and simulation of the supercritical CO2 extraction of vegetable oils - J.Supercrit.Fluid, 2001,19,p.161-175
2. *Lang,Q.; Wai,C.M.* //Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies-a practical review – Talanta, 2001, 53, p.771 -782
3. *Вишняков А.Б., Власов В.Н., и др.* //Масло зародышей пшеницы – мощный природный стимулятор иммунной системы, ООО «Пулат», Парафармацевтика 2004, № 3, с.14-16

ПОЛИСАХАРИДЫ ОСАДОЧНЫХ ДРОЖЖЕЙ ВИНОДЕЛИЯ

Киселица Н., Киселица О., Топалэ Л., Усатый А., Борисова Т., Чеботаренко С.

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

В настоящее время в Молдове остро стоит проблема утилизации отходов винодельческой промышленности. Ранее проведённые исследования показали, 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. Из литературы известно что дрожжи рода *Saccharomyces* являются богатейшим источником ценных полисахаридов (**1, 2, 3**). Целью дальнейших исследований стало определение качественного состава углеводов осадочных винных дрожжей. В опытах были использованы дрожжи, полученные при производстве красного (Cabernet) и белого (Chardonnay) вина, предоставленные Институтом Виноградарства и Виноделия Республики Молдова.

В результате исследований было установлено, что клеточная стенка винных осадочных дрожжей состоит, в основном, из маннанов и β-глюканов, определенных в существенных количествах в дрожжах красных и белых вин.

Также определено, что метод фракционирования углеводов с использованием воды, щелочных и кислых растворов, основанный на методах, описанных в (**4, 5, 6**), позволяет получить из дрожжей красных и белых вин 4 углеводные фракции: 1) водорастворимая, которая составляет 3,4-2,9% от сухого вещества (С.В.), 2) щёлочерастворимая – 3,1 – 3,9% от С.В., 3) кислоторастворимая – 3,6 – 7,6% от С.В., 4) нерастворимая в щёлочи и кислоте – 16,3- 17,4% от С.В. (рисунок 1).

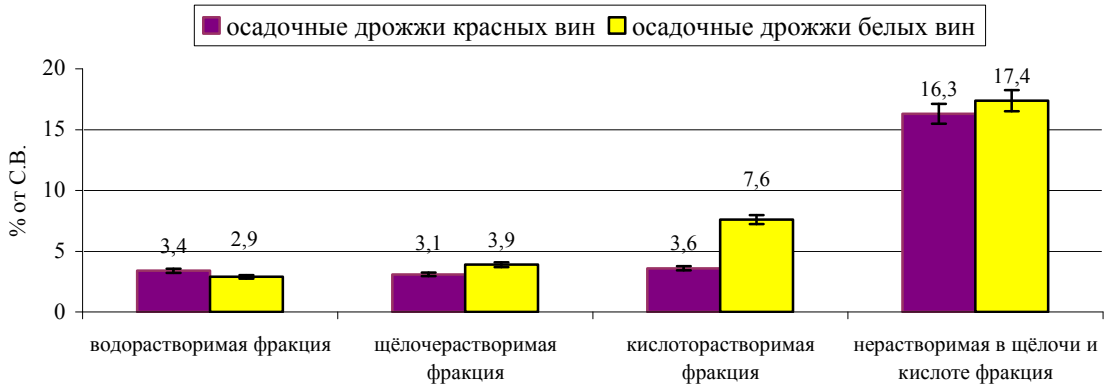


Рис. 1. Фракционный состав углеводов осадочных винных дрожжей, % от сухого вещества.

** Исследования были проведены при поддержке Высшего Совета по Науке и Технологическому Развитию АН Молдовы, независимый проект для молодых учённых 09.819. 08. 03. F «Обработка винных осадочных дрожжей с целью получения углеводов для использования в различных областях».*

Литература:

1. *Jaehrig S. C., Rohn S., Kroh L. W., Widenauer F., Lisdat F., Fleischer L. G. and Kurz T.* // Antioxidative activity of (1-3), (1-6)-β-d-glucan from Saccharomyces cerevisiae grown on different media - LWT-Food Science and Technology, 2008, vol. 41(5), p. 868-877.
2. *Mantovani M. S., Bellini M. F., Angeli J. P., Olivera R. J., Silva A. F., and Ribeiro L. R.* // β-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer - Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2008, vol. 658(3), p. 154-161.
3. *Novak M., Vetvicka V.* // Glucans as biological response modifiers – Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets, 2009, vol. 9, p. 67-75.
4. *Shokri H., Asadi F., Khosravi* R. // Isolation of β-glucan from the cell wall of Saccharomyces cerevisiae – Natural Product Research, 2008, vol. 22(5), p. 414-421.
5. *Suphantharika M., Khunrae P., Thanardkit C., Verduyn C.* // Preparation of spent brever,s yeast β-glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, Penaeus monodon - Bioresource Technology, 2003, vol. 88, p. 55-60.
6. *Thammakiti S., Suphantharika M., Phaesuwan T., Verduyn C.* // Preparation of spent brewer's yeast β-glucans for potential applications in the food industry - International Journal of Food Science & Technology, 2004, vol. 39(1), p. 21-29.

POLYSACCHARIDES OF SEDIMENTARY WINE YEAST

Chiselita N., Chiselita O., Topala L., Usatii A., Borisova T., Cebotarenco S.

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

The *wine industry* of Moldova generates large quantities of *waste* annually. Recent studies have demonstrated that sedimentary yeast is a valuable source of biologically active substances and can be used to elaborate a variety of food additives, protein and vitamin complexes, cosmetic preparations. From the literature it is known that Saccharomyces yeast strain is a source of valuable polysaccharides (1, 2, 3). The aim of further research was to determine the qualitative composition of carbohydrates of sedimentary wine yeast. Yeasts obtained by the production of red (Cabernet) and white (Chardonnay) wine provided by the Institute of Viticulture and Wine of the Republic of Moldova were used in the experiments.

It was established that that the cell wall of sedimentary wine yeast consists mainly of mannans and β-glucans, identified in significant quantities in yeast of red and white wines.

It was determined also that the method of fractionation of carbohydrates using water, alkaline and acidic solutions, based on methods described in (4, 5, 6) lead to the obtaining of four carbohydrate fractions: 1) water soluble, which is 3, 4-2,9% of dry matter (DM), 2) alkaline soluble - 3,1 - 3,9% of the DM, 3) acid soluble - 3,6 - 7,6% of the DM, 4) insoluble in alkaline and acid - 16,3 - 17,4% of the DM from the yeast of red and white wines (Figure 1).

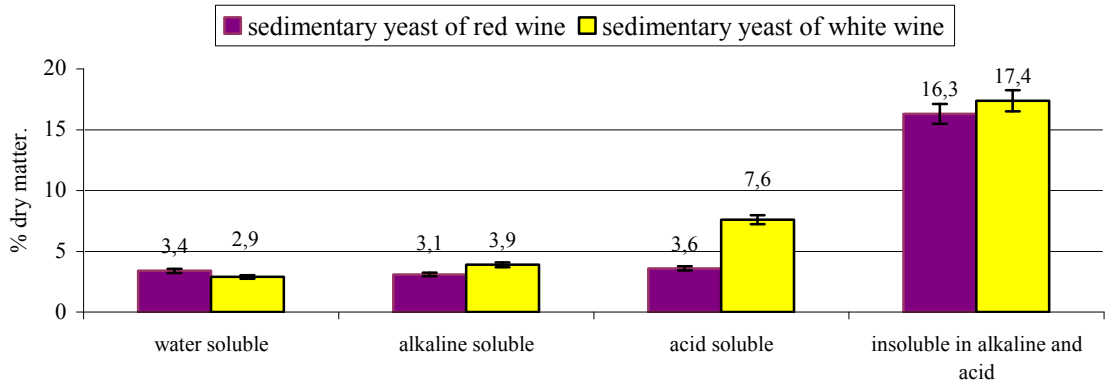


Fig. 1. The composition of fractions of sedimentary wine yeast, % of dry matter.

** Studies were effectuated with the support of the Supreme Council for Science and Technological Development, Academy of Sciences of Moldova, an independent project for young researchers 09.819. 08. 03. F «Processing of wine yeast sediment to obtain carbohydrates for utilization in various fields».*

References:

1. *Jaehrig S. C., Rohn S., Kroh L. W., Widenauer F., Lisdat F., Fleischer L. G. and Kurz T.* // Antioxidative activity of (1-3), (1-6)-β-d-glucan from Saccharomyces cerevisiae grown on different media - LWT-Food Science and Technology, 2008, vol. 41(5), p. 868-877.
2. *Mantovani M. S., Bellini M. F., Angeli J. P., Olivera R. J., Silva A. F., and Ribeiro L. R.* // β-Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer - Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2008, vol. 658(3), p. 154-161.
3. *Novak M., Vetvicka V.* // Glucans as biological response modifiers – Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets, 2009, vol. 9, p. 67-75.
4. *Shokri H., Asadi F., Khosravi R.* // Isolation of β-glucan from the cell wall of Saccharomyces cerevisiae – Natural Product Research, 2008, vol. 22(5), p. 414-421.
5. *Suphantharika M., Khunrae P., Thanardkit C., Verduyn C.* // Preparation of spent brever,s yeast β-glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, Penaeus monodon - Bioresource Technology, 2003, vol. 88, p. 55-60.
6. *Thammakiti S., Suphantharika M., Phaesuwan T., Verduyn C.* // Preparation of spent brewer's yeast β-glucans for potential applications in the food industry - International Journal of Food Science & Technology, 2004, vol. 39(1), p. 21-29.

БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ ЛІПОФІЛЬНИХ ФРАКЦІЙ З ТРАВИ ВИДІВ РОДІВ *ARTEMISIA* L., *POTENTILLA* L., *MELILOTUS* L. І ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ

[1]Ковальова А.М., [1]Ільїна Т.В., [2]Кашпур Н.В., [1]Абдулкафарова Е.Р., [1]Грудько І.В., [1]Очкур О.В.

[1]Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна
e-mail: allapharm@yahoo.com
[2]ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України», Харків, Україна

Комплекси біологічно активних сполук, що містяться у траві видів роду Полин (*Artemisia* L.), Перстачу (*Potentilla* L.) та Буркун (*Melilotus* L.) зумовлюють їх широке застосування в медицині, в тому числі як антибактеріальних засобів. Проте офіцинальними в Україні є такі види цих родів – полин гіркий, перстач прямостоячий та буркун лікарський, решта у фармакогностичному відношенні досліджена недостатньо і застосовується в народній медицині.

Метою нашої роботи стало вивчення хімічного складу ліпофільних витягів з трави найбільш поширених видів – полину гіркого, полину звичайного, полину австрійського, перстачу білого, перстачу гусячого, буркуну лікарського та буркуну білого, заготовлених влітку 2010 р. у фазі цвітіння та визначення їх протимікробної активності.

Об'єктами вивчення стали петролейні, хлороформні та етилацетатно-спиртові (8:2) витяги з повітряно-сухої трави досліджуваних видів, отримані методом вичерпної циркуляційної екстракції в апараті Сокслета у порядку збільшення діелектричної сталої розчинників.

Петролейні фракції об’єктів містять переважно вуглеводні, стерини, тритерпеноїди, серед них: хенейкозан, докозан, трикозан, тетракозан, гептакозан, сквален, нонакозан тощо.

Хлороформні фракції відрізнялись більшим вмістом простих фенольних сполук, терпеноїдних спиртів, терпеноїдних фенолів, альдегідів, спиртів. Хромато-мас-спектрометричним методом було встановлено, що хлороформні фракції полинів містять ліналоол, цис- та транс-пара-мент-2-ен-1-ол, *α*-терпінеол, нерол, каріофілен, *δ*-кадинен, геранілізовалерат, геранілвалерат, геранілбутират, каріофіл-5-ен-12-аль, епі-каріофіл-5-ен-12-аль, *α*-феландренепоксид, 12-нор-каріофіл-5-ен-2-ол, каріофілен, хамазулен та сквален; перстачів – аліфатичні альдегіди (нонаналь, деканаль, тридеканаль, пентадеканаль), ациклічні монотерпеноїди та їх похідні (ліналоол, ліналоолоксид, гераніаль), похідне ациклічного сесквітерпена – *β*-фарнезилацетон, дитерпеновий спирт – фітол та тритерпеноїд – сквален; для буркунів характерні бензиловий спирт, ліналоол, карвакрол, евгенол, 4-вінил-2-метоксифенол, бензил-бензоат, кумарин, дигідрокумарин (мелітол), циклічний спирт інозитол, фітол, жирні кислоти та їх ефіри.

Етилацетатно-спиртові витяги відрізнялися від хлороформних наявністю монозидів гідроксикумаринів, гідроксикоричних кислот, флавонів та флавонолів, фенолкарбонових кислот та їх ефірів. Серед фенольних сполук ідентифіковані саліцилова, *p*-гідроксифенілоцтова, гентизинова, протокатехова, сирінгова, галова, *p*-гідроксикорична, ферулова, ваніліинова кислоти. Виявлені фенолальдегіди (фенілетаналь, *p*-гідроксибензальдегід), фенолоспирти (*p*-гідроксифенілетанол, 4-гідроксифенілпропанол).

Протимікробну активність петролейних, хлороформних та етилацетатно-спиртових фракцій визначали методом дифузії в агар (метод «колодязів»). Для оцінки активності цих субстанцій відповідно до рекомендацій ВООЗ використовували тест-штами *Staphylococcus aureus* 15923, *Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* 2789, *Bacillus subtilis* 6633, *Proteus vulgaris* 4636, *Candida albicans* 885-563. В кожну лунку вводили спиртовий розчин сухих залишків витягів у однаковій концентрації, після чого чашки Петрі розміщували у термостаті на 18-24 години. Ступінь чутливості мікроорганізмів до препарату оцінювали за розмірами зон затримки росту в міліметрах.

Встановлено, що досліджувані ліпофільні фракції в більшій або меншій мірі пригнічують зростання усіх досліджуваних тест-штамів. Особливо високу активність вони виявляють щодо штамів *Staphylococcus aureus* 15923, *Pseudomonas aeruginosa* 2789 та *Bacillus subtilis* 6633, більш помірну - щодо штамів *Escherichia coli* 25922, *Proteus vulgaris* 4636 та *Candida albicans* 885-563.

Найактивнішими серед досліджених фракцій були хлороформні витяги з трави полину гіркого та полину звичайного.

Було досліджено вплив даних ліпофільних витягів на адгезійну та антилізоцимну активність мікроорганізмів, проаналізовано значимість цього впливу в загальну антимікробну дію та виявлено взаємозв'язок активності досліджуваних фракцій з особливостями їхнього хімічного складу.

Аналіз результатів досліджень дозволив виявити кореляцію між вмістом біологічно активних речовин та біологічною дією. Так, наприклад, нами було встановлено кореляцію між вмістом спиртів, фенольних сполук, суми спиртів і фенолів у хлороформних фракціях полинів і зменшенням індексу адгезивності по відношенню до: *E. coli* – на рівні 71,38%, 90,55% і 99,09% відповідно; *N. meningitidis* – на рівні 59,68%, 96,03%, 99,98% відповідно; *C. albicans* – на рівні 74,33%, 88,64%, 98,42% відповідно.

Для окремих тест-штамів мікроорганізмів спостерігається кореляція між вмістом спиртів та зменшенням індексу адгезивності у досліджуваних фракціях полинів: *N. meningitidis* (етилацетатно-спиртові фракції) – 84,13%, *S. pyogenes* (хлороформні фракції) – 90,33%, *S. aureus* (хлороформні фракції) – 91,19%, *P. mirabilis* (хлороформні фракції) – 93,16%.

Висновки. В результаті встановлено виражений взаємозв’язок між окремими групами БАР ліпофільних фракцій і показниками антимікробної активності. Отримані дані свідчать про перспективність досліджуваної рослинної сировини та вказують на доцільність подальших розробок.

BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF LIPOPHILIC FRACTIONS OF HERBS OF GENERA *ARTEMISIA* L., *POTENTILLA* L., *MELILOTUS* L. AND RESEARCH OF THEIR ANTIMICROBIAL ACTIVITY

[1]Kovalyova A.M., [1]Ilyina T.V., [2]Kashpur N.V., [1]Abdulkafarova E.R., [1]Grydko I.V., [1]Ochkur O.V.

[1]National University of Pharmacy, Kharkov, Ukraine
e-mail: allapharm@yahoo.com
[2] SE «Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of AMS of Ukraine», Kharkov, Ukraine

Complexes of biologically active substances in the herbs of tarragon species (*Artemisia* L.), cinquefoil species (*Potentilla* L.) and melilot species (*Melilotus* L.) cause their widespread use in medicine, including as antibacterial agents. However, officially recognized in Ukraine are the following species of genera - the bitter wormwood, *Potentilla erecta* and *Melilotus officinalis*, other species aren't studied well and found their usage in folk medicine.

The **aim** of our work was to study the chemical composition of lipophilic extracts of herbs of the most common species - wormwood, sagebrush plain, Austrian wormwood, white cinquefoil, cinquefoil goose, *Melilotus officinalis* and *Melilotus albus*, harvested in summer 2010 in the flowering stage and determination of their antimicrobial activity .

The **objects** of study were petroleum, chloroform and ethylacetate-alcohol (8:2) extracts of air-dried herbs of studied species, obtained by an exhaustive circulating extraction in the Soxlet apparatus in order of solvents' polarity increase.

Chloroform fraction differed by higher content of simple phenolic compounds, terpenoid alcohols, terpenoid phenols, aldehydes, alcohols. By chromate-mass spectrometric method in chloroform fractions of wormwood linalool, *cis*-and *trans-para*-menth-2-en-1-ol, *α*-terpineol, nerol, kariofilen, *δ*-kadynen, heranilisovalerat, heranilvalerat, heranilbutirat, kariofil-5-en-12-ol, epi-kariofil-5-en-12-ol, *α*-felandrenepoxyde, 12-nor-kariofil-5-ene-2-ol, kariofilen, hamazulen and squalene had been identified; in chloroform fraction of cinquefoil aliphatic aldehydes (nonanal, dekanal, trydekanal, pentadekanal), acyclic monoterpenoids and their derivatives (linalool, linalooloxyde, heranial), acyclic terpene derivative – *β*-pharnesylaceton, diterpene alcohol – phytol and triterpenoid – squalene had been identified; for Melilot herb chloroform fraction coumarin, dyhidrocoumarin, cyclic alcohol inozytol, fatty acids and their esters are typical.

Ethylacetate-alcohol extracts differed from chloroform extracts by the presence of monosides of hydroxycoumarins, hydroxycinnamic acids, flavones and flavonols, phenolcarbonic acids and their esters. Among phenolic compounds salicylic, *p*-hydroxyphenylacetic, gentisinic, protokatehic, syringic, gallic, *p*-hydroxycinnamic, ferulic, vanilynic acids were identified. Phenylaldehydes (phenyletanal, *p*-hydroxybenzaldehyde) and phenylalcohols (*p*-hydroxyphenylethanol, 4-hydroxyphenylpropanol) were revealed.

Study of extracts' antibacterial activity by the method of diffusion in agar has been carried out. According to the WHO recommendations for assessment of the activity of substances reference strains ATSS 25923 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* 6538 ATCC, *Escherichia coli* ATSS 25 922, *Proteus vulgaris* NSTS 4636, *Pseudomonas aeruginosa* 27 853 ATSS, *Pseudomonas aeruginosa* 9027 ATCC, *Bacillus subtilis* ATSS 6633 and *Candida albicans* 885 / 653 ATCC were used. In each well alcoholic solutions of extracts in the same concentration were injected, then Petri dishes were placed in a thermostat for 18-24 hours. The degree of microorganisms' sensitivity to the researched substances was estimated by the size of zones' growth inhibition in millimeters.

It was established that lipophilic fractions to a greater or lesser extent inhibit the growth of all investigated test strains. The highest sensibility was marked for next strains: *Staphylococcus aureus* 15923, *Pseudomonas aeruginosa* 2789 and *Bacillus subtilis* 6633, moderate activity for strains of *Escherichia coli* 25922, *Proteus vulgaris* 4636 and *Candida albicans* 885-563.

The most active among the investigated fractions were chloroform extracts of wormwood and sagebrush plain herbs.

The influence of lipophilic extracts on the adhesion and antilysozyme activity of microorganisms was established, a contribution of this impact to the overall antimicrobial effect was analyzed and the interrelation between antimicrobal activity of substances and their chemical composition was determined.

Analysis of results allowed to identify the correlation between the content of biologically active substances and their biological effects. For example, we have established a correlation between alcohol content, phenolic compounds, summ of alcohols and phenols in chloroform fractions of wormwood and decreased of adhesion index for next microorganisms: *E. coli* – at 71.38%, 90.55% and 99.09% respectively; *N. meningitidis* – at 59.68%, 96.03%, 99.98%, respectively; *C. albicans* – at 74.33%, 88.64%, 98.42%, respectively.

For some test strains correlation between the decrease of adhesion index and alcohol content in the analyzed fractions of wormwood was observed: *N. meningitidis* (ethylacetate-alcohol fraction) – 84,13%, *S. pyogenes* (chloroform fraction) – 90,33%, *S. aureus* (chloroform fraction) – 91,19%, *P. mirabilis* (chloroform fraction) – 93.16%.

Conclusions. As a result a marked correlation between certain groups BAC of lipophilic fractions and parameters of antimicrobial activity. Obtained data show a prospect of investigated plant raw material and specifies on expedience of further research.

ПЕРСПЕКТИВИ МОДИФІКАЦІЇ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ГУСТОГО ЕКСТРАКТУ ХЛОРОФІЛІПТУ

Ковальова А.М., Кошовий О.М., Кухтенко О.С., Комісаренко А.М.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна
e-mail: oleg_koshevoy@mail15.com

Вітчизняною фармацевтичною промисловістю у різних лікарських формах випускається антистафілококовий препарат хлорофіліпт. Відомо, що його основними біологічно активними речовинами (БАР) є похідні хлорофілів *a* та *b* – мідь-заміщені порфірини, та терпеноїди. Продовжуючи дослідження БАР евкаліпту прутовидного та препаратів на його основі, ми звернули увагу на те, що деякі параметри процесу виготовлення хлорофіліпту є практично не обґрунтовані, зокрема стадія очистки екстракту, яку проводять додаванням 4% розчину сульфату міді та бензолу, який є кров'яною отрутою, неточна оцінка ролі катіонів міді (II) у технології лікарського препарату що приводило до перевитрати міді сульфату, утворення великих об'ємів рідких відходів, що містять органічний розчинник і мідь [1].

Тому, **метою** наших досліджень було встановити можливість заміни бензолу на менш токсичний органічний розчинник, шляхом вивчення хімічного складу отриманих модифікованих екстрактів та їх антимікробної активності.

Об'єктами дослідження були густий модифікований спиртовий екстракт з листя *Eucalyptus viminalis Labill.* (сер. 50609, ЗАТ "Ліктрави", м. Житомир), отриманій з використанням гексану, та густий екстракт хлорофіліпту (сер. 331109, ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС», м. Харків).

Для проведення спиртової екстракції 100,0г, подрібненого шляхом вальцювання до розмірів часток 2,5–3,0мм, сухого листя евкаліпту прутовидного заливали 500мл 96% етилового спирту та настоювали при кімнатній температурі протягом 8 годин. Екстракцію проводили тричі. Екстракти об'єднували, відганяли розчинник та отримали густий екстракт, який в подальшому очищали.

Для заміни бензолу в процесі очистки цього екстракту використовували різні полярні органічні розчинники: етилацетат, ацетон, хлороформ, бензин-калоша та гексан, проте ряд з них мають недоліки, які потрібно враховувати. Етилацетат в процесі очистки гідролізується; ацетон є прекурсором, що ускладнює його використання в промисловості; хлороформ має велику густину та весь осад, який утворюється, знаходиться в органічній фазі; бензин-калоша дуже важко видаляється з екстракту; тому найбільш доцільно з доступних розчинників було використовувати гексан.

Для ідентифікації БАР у екстрактах використовували методи тонкошарової (ТШХ), газової (ГХ) та газорідинної хроматографії (ГРХ). В екстрактах були ідентифіковані терпеноїди та хлорофіли *a* та *b*.

В отриманих екстрактах проводили визначення кількісного вмісту основних груп ідентифікованих БАР. Кількісне визначення хлорофілів проводили спектрофотометричним методом. Оптичну густину вимірювали у кюветі з товщиною шару 10мм на спектрофотометрі Specol 1500 при 649 та 665 нм [2].

Для статистичної достовірності досліди проводили не менше п'яти разів. Кількісне визначення терпеноїдів проводили методом ГХ. В густому модифікованому екстракті з листя евкаліпту прутовидного виявлено 42 речовини, 37 з яких ідентифіковано, а в густому екстракті хлорофіліпту – 35, з яких ідентифіковано 28. Серед терпеноїдів основне фармакологічне навантаження несуть *α*-терпеніол, терпінен-4-ол, міртенол, (+)-ізоментол, 1,8-цинеол, *α*-феландрен, *α*- і *β*-пінени, *trans*-пінокарвеол, аромадендрен, спатуленол, еудесмол, *α*-селінен, леден, *α*- і *β*-гур'юнени, глобулол, віридифлорол; серед фенолкарбонових кислот – галова і елагова; серед фенолоальдегідів **–** терпеноїдні фенолоальдегіди флороглюцинового ряду (еуглобалі).

В обох екстрактах домінуючими речовинами є *α*-феландрен, 1,8-цинеол, аромадендрен, леден та глобулол.

В густому модифікованому екстракті з листя евкаліпту прутовидного вміст терпеноїдів складає 17,6±0,02 %, хлорофілів *a* та *b* – 2,22±0,01%, а в густому екстракті хлорофіліпту вміст терпеноїдів - 4,3±0,02 %, хлорофілів *a* та *b* - 3,31±0,01%.

Вивчення антибактеріальної активності екстрактів проводили методом дифузії в агар в Інституті мікробіології та імунології ім. І.І. Мечнікова в лабораторії біохімії мікроорганізмів та живильних середовищ під керівництвом к.біол.н. Осолодченко Т.П. Відповідно до рекомендацій ВООЗ для оцінки активності препаратів використовували референс-штамы *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 6538 ATCC, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* NCTC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* 9027 ATCC, *Basillus subtilis* ATCC 6633 та *Candida albicans* 885/653 ATCC. Для дослідження використовували 1 % спиртові розчини екстрактів.

Встановили, що модифікований екстракт з листя евкаліпту прутовидного та хлорофіліпт виявляють антимікробну активність майже на одному рівні по відношенню до *S. aureus* та *B. subtilis*.

Таким чином, результати хімічного та мікробіологічного вивчення БАР екстрактів обґрунтували доцільність заміни бензолу на менш токсичний гексан в процесі очистки спиртового екстракту з листя евкаліпту, удосконалення технології якого потребує нових наукових досліджень.

Література:

1. Пат. № 5242 Україна, МПК А61К35/78. Спосіб одержання хлорофіліпту / В.Л. Надтока, Н.Г. Божко, А.О. Грижко. - № 2753048/SU; Заявл. 25.04.79; Опубл. 28.12.94, Бюл. № 7-1.
2. *Туманов В.Н.* Качественные и количественные методы исследования пигментов фотосинтеза / В.Н. Туманов, С.Л. Чирук. – Гродно: ГрГУ им. Я.Купалы, 2007. – 62 с.

PROSPECTS OF CHLOROPHYLLIPT THICK EXTRACT OBTAINING TECHNOLOGY MODIFICATION

Kovalyova A.M., Koshevoy O.M., Kukhtenko A.S., Komisarenko A.M.

National University of Pharmacy, Kharkov, Ukraine
e-mail: oleg_koshevoy@mail15.com

Domestic pharmaceutical industry produces anti- staphylococcus drug chlorophyllipt in various pharmaceutical dosage forms. It is known that its main biologicslly active substances (BAS) are the derivatives of chlorophylls a and b - copper-substituted porphyrins, and terpenoids. Continuing research of eucalyptus BAS and preparations based on it, we have noticed that some parameters of the chlorophyllipt manufacturing process are hardly justified, in particular extract purification stage, carried out by addition of 4% copper sulfate and benzene solution, which is a blood poison , inaccurate assessment of the role of copper (II) cations in drug technology that had led to the overspending of copper sulphate, formation of large amounts of liquid waste containing organic solvents and copper [1].

Therefore, the aim of our research was to ascertain the possibility of replacing benzene by less toxic organic solvent, by studying the chemical structure of the obtained modified extracts and their antimicrobial activity.

Objects of research were modified thick alcohol extract of *Eucalyptus viminalis* Labill leaves. (Avg. 50 609, for "Liktravy", Zhitomir), obtained using hexane, and the thick extract chlorophyllipt (Avg. 331 109, OOO" RS "HNTSLS, Kharkov).

For the alcohol extraction of 100.0 g dried eucalyptus leaves crushed by rolling to a particle size 2,5-3,0 mm, filled 500ml 96% ethanol and insisted at room temperature for 8 hours. Extraction was performed three times. Extracts have been united, solvent has been distillated and thick extract has been obtained, which later has been cleared.

To replace benzene during purification of the extract various polar organic solvents has been used: ethyl acetate, acetone, chloroform, benzene-shoe and hexane, but some of them have shortcomings that need to be considered. Ethyl acetate hydrolyzes during purification, acetone is a precursor, which complicates its use in industry, chloroform has a high density and all the sediment that is formed is in the organic phase, gasoline-shoe is very difficult to remove from the extract, so the most appropriate of the available solvents is hexane.

For identification of BAS in the extracts we have used methods of thin layer (TLC), gas (GC) and gas-liquid chromatography (HLC). In the extracts terpenoids and chlorophylls a and b.were identified

In the extracts obtained quantitative determination of the major groups of identified BAS has been performed. Quantitative determination of chlorophylls has been performed by spectrophotometric method. Optical density has been measured in the cuvette of 10mm thick layer on the spectrophotometer Specol 1500 at 649 and 665 nm [2].

For statistical accuracy experiments have been performed at least five times. Quantification of terpenoids has been conducted by GC. In thick modified eucalyptus leaves extract 42 substances were revealed, 37 have been identified, and in the thick extract chlorophyllipt – 35 were fuond, of which 28 has been identified. Among the terpenoids principal pharmacological load is beared by *α*-terpeniol, terpinen-4-ol, mirtenol, (+)-izomenthol, 1,8-cyneol, *α*-felandren, α - and β-pinens, trans-pinocarveol, aromadendren, spatulenol, eudesmol , *α*-selinen, ledene, α - and β-huryunens, globulol, virydyflorol; among phenol carboxylic acids - ellagic and gallic, among phenoloaldehydes - terpenoid phenoloaldehydes floroglucyne range (euhlobali).

Both extracts' dominant substances are *α*-felandren, 1,8-cyneol, aromadendren, ledene and globulol. In thick modified eucalyptus leaves extract terpenoids content is 17,6 ± 0,02%, chlorophylls *a* and *b* - 2,22 ± 0,01%, and in the thick chlorophyllipt extract terpenoids content is 4,3 ± 0,02%, chlorophylls *a* and *b* - 3,31 ± 0,01%.

Study of extracts' antibacterial activity by the method of diffusion in agar has been carried out at the Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology in the laboratory of biochemistry of microorganisms and culture media. According to the WHO recommendations for assessment of the activity of preparations reference strains *Staphylococcus aureus* ATSS 25923, *Staphylococcus aureus* 6538 ATCC, *Escherichia coli* ATSS 25 922, *Proteus vulgaris* NSTS 4636, *Pseudomonas aeruginosa* 27 853 ATSS, *Pseudomonas aeruginosa* 9027 ATCC, *Basillus subtilis* ATSS 6633 and *Candida albicans* 885 / 653 ATCC were used. 1% alcohol extracts solutions were used.

It has been found that a modified extract from the leaves of eucalyptus and chlorophylipt demonstrates antimicrobial activity almost on a par in relation to *S. aureus* and *B. subtilis*.

Thus, the results of chemical and microbiological study of extracts' BAS proved I expediency of replacement of benzene solution by a less toxic hexane in the process of cleaning alcohol extract of eucalyptus leaves. New research is needed to improve the technology.

References:

1. Пат. № 5242 Україна, МПК А61К35/78. Спосіб одержання хлорофіліпту / В.Л. Надтока, Н.Г. Божко, А.О. Грижко. - № 2753048/SU; Заявл. 25.04.79; Опубл. 28.12.94, Бюл. № 7-1.
2. *Туманов В.Н. К*ачественные и количественные методы исследования пигментов фотосинтеза / В.Н. Туманов, С.Л. Чирук. – Гродно: ГрГУ им. Я.Купалы, 2007. – 62 с.

АРОМАТИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ ВИДОВ РОДА *GALIUM* L.

Ковалева А.М., Ильина Т.В., Горячая О.В.

Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина
e-mail: ilyinatany@rambler.ru

Представители рода Подмаренник – *Galium* L. не являются официнальными видами. Известно, что подмаренники содержат в корневищах и корнях – ализариновые антраценпроизводные, в траве – эфирное масло, фенолкарбоновые кислоты, кумарины, флавоноиды, дубильные вещества и сапонины. Из липофильных веществ исследовались, в основном, иридоиды и терпеноиды эфирных масел некоторых видов.

Целесообразно было провести сравнительное изучение компонентного состава эфирных масел подмаренников, произрастающих на территории Украины.

Целью работы стало сравнительное исследование компонентов эфирных масел травы семи видов подмаренников.

Объектами исследования служила трава подмаренников: п. настоящего – *Galium verum* L., п. распростертого – *G. humifusum* Bieb., п. карпатского – *G. carpaticum* Klok., п. герцинского – *G. hercynicum* Weigel., п. иволистного – *G. salicifolium* Klok., п. пушистоногого – *G. dasypodum* Klok., п. крестообразного – *G. cruciata,* (L.) Scop., п. весеннего – *G. vernum* Scop., заготовленные в июне 2010г. в Харьковской, Ивано-Франковской областях и АР Крым.

Для получения эфирного масла использовали метод гидродистилляции с последующей обработкой дистиллята особо чистым пентаном, позволяющий выделить эфирное масло, содержащееся в растительном сырье в минорных или следовых количествах.

Установление компонентного состава эфирного масла травы исследуемых видов проводили на хроматографе Agilent Technology 6890N с масс-спектрометрическим детектором 5973N. Соединения идентифицировали путем сравнения результатов, полученных в процессе хроматографирования, масс-спектров веществ со стандартами и данными библиотеки масс-спектров NIST02.

Среди идентифицированных соединений моноциклические ароматические терпеноиды – тимол и карвакрол – в больших количествах обнаружены в эфирном масле п. распростертого (9,11% и 1,14%), п. герцинского – (12,39% и 10,22%), п. карпатского – (2,803% и 1,686%), тимол был выявлен также в эфирном масле п. крестообразного и п. весеннего. Эвгенол обнаружен в эфирном масле п. карпатского (0.82%), п. иволистного, п. крестообразного и п. весеннего. 2-Метокси-4-винилфенол найден в эфирном масле п. настоящего (1,58%), п. карпатского (0,65%), п. распростертого (1,21%), п. иволистного, п. крестообразного и п. весеннего. *p*-Цимен содержится в эфирном масле п. карпатского (9,156%), п. распростертого (5,931%) и– п. весеннего в следовых количествах; *p*-цимен-8-ол – в эфирном масле п. весеннего и п. крестообразного. Фенилацетальдегид обнаружен в эфирном масле п. карпатского (2,12%), п. распростертого (4,75%), п. иволистного, п. крестообразного и п. весеннего. Бензальдегид выявлен в эфирном масле п. иволистного, п. крестообразного и п. весеннего.

Подмаренник настоящий в составе эфирного масла содержит бензиловый спирт, 4-винилфенол, *o*-аминоацетофенон, 4-винил-2-метоксифенол, бензнитрил. Среди компонентов эфирного масла доминирует бензиловый спирт.

В эфирном масле подмаренника карпатского обнаружены *p*-цимен (9,156%), фенилацетальдегид (2,123%), тимол (2,803%), карвакрол (1,686%), 2-метокси-4-винилфенол (0,648%) и эвгенол (0,820%). Тимол и карвакрол сближают подмаренник карпатский с отдельными представителями рода Подмаренник, такими как подмаренник распростертый и подмаренник герцинский. Доминирующие соединения: фенольное – *p*-цимен, ароматическое – 2-метилбензальдегид (4,512%), терпеноид – *β*-ионол (3,681%) являются специфическими для подмаренника карпатского и существенно отличают его от других видов.

Для подмаренника распростертого характерны *β*-фенилэтиловый спирт (0,355%), 2-метилбензальдегид (10,720%), фенилацетальдегид (4,749%), тимол (9,112%), карвакрол (1,137%), 2-метокси-4-винилфенол (1,210%), 1-метилнафталин (0,221%), *p*-цимен (5,931%).

В подмареннике иволистном в незначительных количествах найдены бензальдегид, фенилацетальдегид, 2-метокси-4-винилфенол, 2,4-бис-трет-бутилфенол, эвгенол.

Для п. пушистоногого оригинальным веществом является 6-фенилтридекан; для подмаренника крестообразного и п. весеннего характерны бензальдегид, фенилацетальдегид, *p*-цимен, *p*-цимен-8-ол, 2-метокси-4-винилфенол, тимол, эвгенол, 2-метилфенол, 6-терт-бутил-2-метилфенол и бензофенон.

Исследования биологической активности субстанций, полученных на основе суммарных комплексов биологически активных веществ эфирных масел исследуемых подмаренников, показали выраженное антимикробное действие в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* 15923, *Pseudomonas aeruginosa* 2789, *Bacillus subtilis* 6633, *Escherichia coli* 25922, *Proteus vulgaris* 4636 и *Candida albicans* 885-563. Установлена корреляция между количественным содержанием в субстанциях фенольных веществ и степенью антимикробной активности.

Выводы. Впервые проведен анализ качественного и количественного состава эфирных масел травы подмаренника настоящего, п. карпатского, п. распростертого, п. герцинского, п. иволистного, п. крестообразного и п. весеннего, произрастающих на территории Украины, в результате которого были обнаружены и установлено количественное содержание в эфирных маслах ароматических соединений, обладающих разнообразными фармакотерапевтическими свойствами, что представляет практический интерес для фармации.

ARYL COMPOUDS OF BEDSTRAWS' ESSENTIAL OILS

Kovalyova A.M., Ilyina T.V., Goryacha O.V.

National University oh Pharmacy, Kharkov, Ukraine
e-mail: ilyinatany@rambler.ru

Representatives of the genus Bedstraw - *Galium* L. are not officinal species. Bedstraws contain: in roots and rhizomes anthraquinone derivates of alizarin group, in herb – essential oil, phenolcarbonic acids, coumarins, flavonoids, tannic materials and saponins. Among lipophylic compounds of essential oils iridoids and terpenoids of some species were studied.

It was appropriate to carry out a comparative research of essential oils' components of bedstraws growing in Ukraine.

An **purpose** of this work was a comparative research of herb's essential oils of seven bedstraws species.

As the **objects** of research served herbs of next species: Lady's Bedstraw – *Galium verum* L., Spreading Bedstraw – *G. humifusum* Bieb., Carpathian Bedstraw – *G. carpaticum* Klok., Hercynian Bedstraw – *G. hercynicum* Weigel., *G. salicifolium* Klok., *G. dasypodum* Klok., Cruciform Bedstraw – *G. cruciata* (L.) Scop., Spring Bedstraw – *G. vernum* Scop., harvested in June 2010 in Kharkiv, Ivano-Frankovsk regions and in AR Crimea.

In order to obtain the essential oil from the raw material pour with it a method of hydrodistillation with farther treatment with ultrapure distilled pentane had been used.

An establishment of essential oils' component content was carried out on chromatograph Agilent Technology 6890N with mass-spectrometric detector 5973N. Compounds were identified by comparing the results obtained in the process of chromatography, mass spectra of substances with the data of mass-spectra library NIST02.

Among the identified monocyclic aryl terpenoids - thymol and carvacrol - in large quantities were found in the essential oils of Spreading Bedstraw (9.11% and 1.14%), Hercynian Bedstraw - (12.39% and 10.22%), Carpathian Bedstraw - (2.803% and 1.686%), thymol was also identified in the essential oils of Cruciform Bedstraw and Spring Bedstraw. Eugenol is found in the essential oils of Carpathian Bedstraw (0.82%), *G. salicifolium* Klok., Cruciform Bedstraw and Spring Bedstraw. 2-Methoxy-4-vinylphenol in the essential oils of Lady's Bedstraw (1,58%), Carpathian Bedstraw (0,65%), Spreading Bedstraw (1,21%), *G. salicifolium* Klok., Cruciform Bedstraw and Spring Bedstraw was found. *p*-Cymen was identified in the essential oils of Carpathian Bedstraw (9.156%), Spreading Bedstraw (5.931%) and in trace amounts it was found in the essential oil of Spring Bedstraw. *p*-Cymen-8-ol in the essential oils of Spring Bedstraw and Cruciform Bedstraw was identified. Phenylacetaldehyde in the essential oils of Carpathian Bedstraw (2,12%), Spreading Bedstraw (4,75%), P. ivolistnogo, Cruciform Bedstraw and Spring Bedstraw was found. Benzaldehyde was determined in the essential oils of *G. salicifolium* Klok., *G. cruciata* (L.) Scop. and *G. vernum* Scop.

Among components of Lady's Bedstraw's essential oil benzylalcohol, 4-vinylphenol, *o*-aminoacetophenone, 4-vinyl-2-methoxyphenol, benznitryl were identified. Benzylalcohol was the dominant component.

In essential oil of *Galium carpaticum* *p*-cymen (9.156%), phenylacetaldehyde (2.123%), thymol (2.803%), carvacrol (1.686%), 2-methoxy-4-vinylphenol (0.648%) and eugenol (0.820%) were identified. Thymol and carvacrol bring together Carpathian Bedstraw with the representatives of *Galium* genus, such as Spreading Bedstraw and Hercynian Bedstraw. The dominant compounds: phenolic - *p*-cymen, aryl - 2-metilbenzaldehyde (4.512%), terpenoids - *β*-ionol (3.681%) are specific for Galium *carpaticum* and significantly differ it from other species.

For Spreading Bedstraw *β*-phenylethylalcohol (0.355%), 2-metilbenzaldehyde (10.720%), phenylacetaldehyde (4.749%), thymol (9.112%), carvacrol (1.137%), 2-methoxy-4-vinylphenol (1.210%), 1-methylnaphthalene (0,221%), *p*-cymen (5.931%) are typical compounds.

In *Galium salicifolium* Klok. benzaldehyde, phenylacetaldehyde, 2-methoxy-4-vinylphenol, 2,4-bis-tert-butylphenol, eugenol in small amounts were found.

For *Galium dasypodum* Klok. as an original substance is 6-pheniltridekan; for *G. cruciata* and *G. vernum* original substances are benzaldehyde, phenylacetaldehyde, *p*-cymen, *p*-cymen-8-ol, 2-methoxy-4-vinylphenol, thymol, eugenol, 2-methylphenol, 6-tert-butyl-2-methylphenol and benzophenone.

Researches of biological activity of substances, obtained from the total complex of biologically active compounds of studied essential oils, showed pronounced antimicrobial activity against strains of *Staphylococcus aureus* 15923, *Pseudomonas aeruginosa* 2789, *Bacillus subtilis* 6633, E*scherichia coli* 25922, *Proteus vulgaris* 4636 and *Candida albicans* 885-563. The correlation between the quantitative content of phenolic compounds of studied substances and the degree of antimicrobial activity was established.

Conclusions. For the first time an analysis of qualitative and quantitative composition of Lady's Bedstraw, Spreading Bedstraw, Carpathian Bedstraw, Hercynian Bedstraw, *G. salicifolium* Klok., Cruciform Bedstraw, Spring Bedstraw herb's essential oils (that grows on the territory of Ukraine) had been carried out. As a result aryl compounds were identified and quantified in essential oils that possess diverse pharmacotherapeutic properties. The found results are of practical interest to the pharmacy.

ЭНАНТИОМЕРЫ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *PINUS*

[1]Коваленко Н.А., [1]Супиченко Г.Н., [2]Шутова А.Г., [1]Леонтьев В.Н., [1]Шишлянникова А.А.

[1]Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь
[2*]ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь
e-mail: anna_shutova@mail.ru

Эфирные масла представителей рода *Pinus* содержат ценные биологически активные компоненты и широко используются в медицине, поскольку обладают иммуномодулирующими, антимикробными, противовоспалительными свойствами.

Важную роль в проявлении лечебных свойств эфирных масел играет оптическая активность входящих в их состав веществ, поскольку оптические изомеры одного и того же соединения могут оказывать различное действие на организм.

Практическое применение в фармакологической практике эфирных масел лекарственных растений возможно при условии, что их состав является постоянным. Однако в действительности качественный и количественный состав эфирных масел, а также особенности распределения энантиомеров основных компонентов зависят от многих факторов, таких как географические и климатические условия произрастания растений, технология переработки растительного сырья и т.д. Поэтому хироспецифический анализ имеет огромное значение при определении происхождения и подлинности эфирных масел. Данные хироспецифических исследований могут служить критерием для контроля качества эфирных масел и лекарственных препаратов на их основе.

В литературе отсутствуют данные о распределении энантиомеров в эфирных маслах хвойных деревьев, произрастающих или интродуцированных в условиях Республики Беларусь. В этой связи установление особенностей распределения энантиомеров компонентов эфирных масел хвои рода *Pinus* в условиях центральной агроклиматической зоны Беларуси является актуальной задачей.

В рамках поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- оптимизировать условия хроматографического разделения энантиомеров α-, β-пиненов, 3-карена, камфена и лимонена в эфирных маслах хвойных растений рода *Pinus*;
- идентифицировать энантиомеры α-, β-пиненов, 3-карена, камфена и лимонена в образцах эфирных масел представителей рода *Pinus*;
- провести количественное определение энантиомеров α- и β-пиненов, 3-карена, камфена и лимонена.

Объектами исследования являлись эфирные масла, выделенные из охвоенных концов ветвей длиной 30-40 см сосен из коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Исследования касались следующих представителей рода *Pinus*: сосны кедровой (*Pinus pumila* (Pallas) Regel), сосны кедровой корейской (*Pinus koraiensis Sieb. et Zucc.*), сосны кедровой европейской (*Pinus cembra* L.), сосны Гриффита (*Pinus griffithii* Parl.), сосны сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour).

Выделение эфирных масел проводили методом гидродистилляции.

Разделение компонентов эфирного масла выполняли на хроматографе «Цвет 800», оснащенном пламенно-ионизационным детектором и оборудованном капиллярной колонкой Cyclosil B длиной 30 м, внутренним диаметром 0,32 мм и неподвижной фазой β-циклодекстрин (0,25 мкм), в следующем температурном режиме: изотерма при 70ºС в течение 5 мин, подъем температуры до 115ºС со скоростью 3º/мин, изотерма в течение 20 мин, затем подъем температуры со скоростью 4º/мин до 200ºС, изотерма в течение 10 мин в токе газа-носителя азота. Линейная скорость азота 16,2 см/с, величина сброса 1:26. Объем вводимой пробы – 1 мкл. Временем удерживания несорбирующегося газа считали время выхода пика метана. В качестве реперных компонентов для расчета обобщенных индексов удерживания (GI) использовали *н*-алканы C_7–C_{16}.

Идентификацию компонентов эфирных масел и их энантиомеров проводили сравнением рассчитанных значений GI с литературными данными и значениями GI стандартных образцов (Fluka Inc.).

Количественные определения оптических изомеров в эфирных маслах проводили с использованием метода внутренней нормализации по площадям газохроматографических пиков без использования корректирующих коэффициентов.

В докладе приводятся данные по содержанию основных компонентов эфирных масел исследованных видов *Pinus.* Идентифицированы и определены энантиомеры α- и β-пиненов, 3-карена, камфена и лимонена. Изучены особенности распределения право- и левовращающих изомеров перечисленных соединений в эфирных маслах.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии индивидуальных особенностей энантиомерного состава эфирных масел различных представителей рода *Pinus.* Характер распределения энантиомеров α- и β-пиненов, 3-карена, камфена и лимонена является индивидуальной характеристикой каждого эфирного масла и может быть использован для идентификации, стандартизации и установления подлинности образцов эфирных масел представителей рода *Pinus*, а также фитопрепаратов на их основе.

ESSENTIAL OILS ENANTIOMERS OF SOME *PINUS* PLANTS

[1]Kovalenko N., [1]Supitchenko G., [2]Shutava H., [1]Leontiev V., [1]Shishliannikova A.

[1]BSTU, Minsk, Belarus
[2]CBG NAN of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: anna_shutova@mail.ru

Essential oils of *Pinus* plants contain valuable biologically active components and are widely used in medicine as possess immunomodulatory, antimicrobic, anti-inflammatory properties.

The important role in display of medical properties of essential oil is played by optical activity of substances as optical isomers of the same compounds can have various effect on an organism.

Practical application in pharmacological practice of essential oils of herbs probably provided that their composition is constant. However actually qualitative and quantitative composition of essential oil, and enantiomer distribution depends on many factors, such as geographical and environmental conditions of plant growth, technology of processing of vegetative raw materials etc. Therefore the enantiomeric analysis has huge value at definition of origin and authenticity of essence. The data of enantiomeric researches can serve as criterion for quality assurance of essential oils and phytopreparations on their basis.

In the literature there is no data about emamtiomeric distribution in essential oils of coniferous trees, growing in Belarus. Thereupon the establishment of enantiomeric distribution of essential oils compounds of needles of *Pinus* sort in the conditions of the central agroclimatic zone of Belarus is an actual problem.

It was necessary to solve following problems:

• to optimize chromatographic conditions of enantiomer division of α -, β-pinene, 3-carene, camphene and limonene in essential oils of coniferous plants of *Pinus*;

• to identify α -. β-pinene, 3-carene, camphene and limonene in samples of essential oils of representatives of *Pinus*;

• to spend quantitative definition of α -, β-pinene, 3-carene, camphene and limonene.

Objects of research were essential oils allocated from the ends of branches (length 30-40 sm) of pines from a collection of Central botanical garden of NAS of Belarus: Siberian dwarf pine (*Pinus pumila* (Pallas) Regel), Korean pine (*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.), Swiss stone pine (*Pinus cembra* L.), Himalayan white pine (*Pinus griffithii* Parl.), Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour).

Essential oils was prepared using the hydrodistillation method. Oil sample analyses were performed on a «Tsvet-800» gas chromatograph (FID) equipped with a Cyclosil B capillary column 30 m × 0.32 mm, 0.25 μm film thickness composed of β-cyclodextrin, temperature programmed as follows: 70° 5 min, 70°– 115°C at 3°C/min, 115°C 20 min, 115 - 200°C at 4°C/min, 200 °C 10 min. The carrier gas was N_2 at a flow of 16.2 sm/c. Samples were injected by splitting and the split ratio was 1:26. Volume of entered sample – 1 μl. As refer components for calculation of GC retention indexes (RI) used n-alkanes C7–C16.

Compounds were identified by comparing their RI with those of reference enantiomers, were obtained from Fluka Chem. Co and literary data.

Quantitative definitions of optical isomers in essential oils spent with a method of internal normalization on the areas peaks without use of correcting factors.

In the report the data under the content of the basic compounds of *Pinus* essential oils is cited. Enantiomers of α -, β-pinene, 3-carene, camphene and limonene are identified and defined. Distribution the right - and left-handed isomers in essential oils are studied.

The received experimental data testify to presence individual distribution of essential oil enantiomers in *Pinus*. Distribution of enantiomers of of α -, β-pinene, 3-carene, camphene and limonene is individual for essential oil of each sort of Pinus Family and can be used for identification, standardization and determination of authenticity of essential oils samples of *Pinus* and phytopreparations on their basis.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ ФЛАВОНОЇДІВ У РОСЛИНАХ РОДУ *GEUM L.*

Козира С.А., Кулагіна М.А., Радько О.В., Сербін А.Г.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна
e-mail: Kozyra-S@yandex.ru

В Україні близько 50% лікарських засобів виготовляється з рослинної сировини, зібраної у природних умовах. Увагу дослідників фенольні сполуки привертають як біологічно активні речовини, які зумовлюють фармакологічну дію великої кількості лікарських форм на основі рослинної сировини [2, 5].

Рослини роду *Geum* (гравілат) відносяться до родини *Rosaceae* підродини *Rosoideae.* 3 види *G. aleppicum* Jacq. (г. алепський), *G. rivale* L. (г. річковий) та *G. urbanum* L. (г. міський) – зростають по всій території України і використовуються у народній медицині як протизапальні, жовчогінні, кровоспинні і ранозагоювальні засоби [3].

Стосовно попереднім хімічним дослідженням у траві та кореневищах з коренями рослин роду *Geum* L. встановлено наявність значної кількості дубильних речовин, флавоноїдів, гідроксикоричних кислот, тому визначення суми флавоноїдів у сировині вивчаємих видів викликає певну зацікавленість.

За об'єкти дослідження були обрані трава (*Herba Gei*) і кореневище з коренями (*Rhizomata cum radicibus Gei*), які були заготовлені в 2007-2009 рр. у м. Харкові та Харківській області.

Нами проведено спектрофотометричне визначення суми флавоноїдів у траві і кореневищах з коренями трьох вивчаємих видів роду *Geum* L. в перерахунку на рутин. Використано метод диференційної спектрофотометрії, який є найбільш поширеним. Робочим діапазоном довжин хвиль для флавоноїдів служить довгохвильовий максимум 330-370 нм. При реакції комплексоутворення з алюмінію хлоридом виникає батохромний зсув першої смуги поглинання флавоноїдів в межах 385-460 нм. [1, 2, 4].

Результати кількісного визначення флавоноїдів у вегетативних органах досліджуваних видів роду *Geum* L. наведені на рис.1.

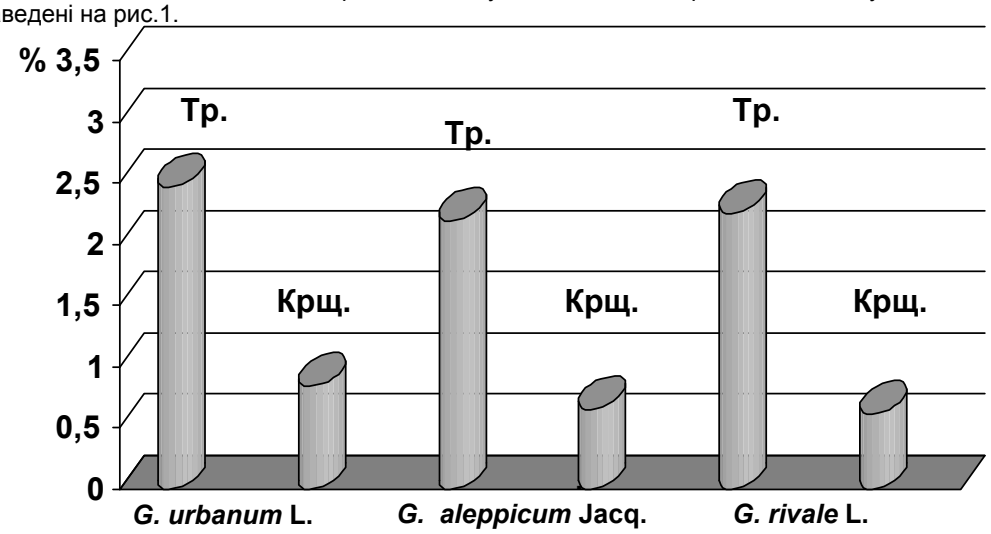


Рис. 1. Кількісне визначення суми флавоноїдів в рослинах роду *Geum* L.

Примітки: Тр. – трава, Крщ. – кореневище з коренями.

Отримані дані свідчать, що найбільшу суму флавоноїдів містить трава *G. urbanum* L., *G. aleppicum* Jacq. і *G. rivale* L. – 2,47%, 2,19% і 2,25% відповідно. Таким чином, одержані результати вказують на перспективність подальшого поглибленого фармакогностичного та фармакологічного вивчення трави рослин роду *Geum* L.

Література:

1. *Беликов В. В.* Избирательный метод анализа флавоноидов и фитохимических препаратов / В. В. Беликов, Т. В. Точкова, Н. Т. Колесник // Проблемы стандартизации и контроля качества лекарственных средств : Всес. конф., г. Москва, 18–21 дек. 1991 г. – М., 1991. – С. 13–14.
2. *Георгиевский В. П.* Физико–химические методы анализа активных веществ растительного происхождения / В. П. Георгиевский, А. Н. Казаринов, Н. О. Каррыев. – Ашхабад : Ылым, 1976. – 238 с.
3. Определитель высших растений Украины / Д. Н. Доброчаева, М. И. Котов, Ю. Н. Прокудин и др. – [2-е изд-е стереот.]. – К. :Фитосоциоцентр, 1999. – 548 с.
4. *Harborne J. B.* Advances in flavonoid research since 1992 / J. B. Harborne, C. A. Williams // Phytochemistry. – 2000. – Vol. 55, № 6. – P. 481–504.
5. *Oyvind E.* Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications / E. Oyvind, M. Andersen, R. Markham. – N-Y : CRC Press; Taylor & Francis Group, 2006. – 1212 p.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS SUM IN THE PLANTS OF *GEUM* L. GENUS.

Kozyra S.A., Kulagina M.A., Radko E.V., Serbin A.G.

National pharmaceutical university, Kharkov, Ukraine
e-mail: Kozyra-S@yandex.ru

About 50% of medicinal drugs in Ukraine are made from a plant row material aggregated in natural conditions. Phenol compounds are interesting for researchers as biologically active substances which determine the pharmacological action of many medicinal forms based on a plant row material [2, 5].

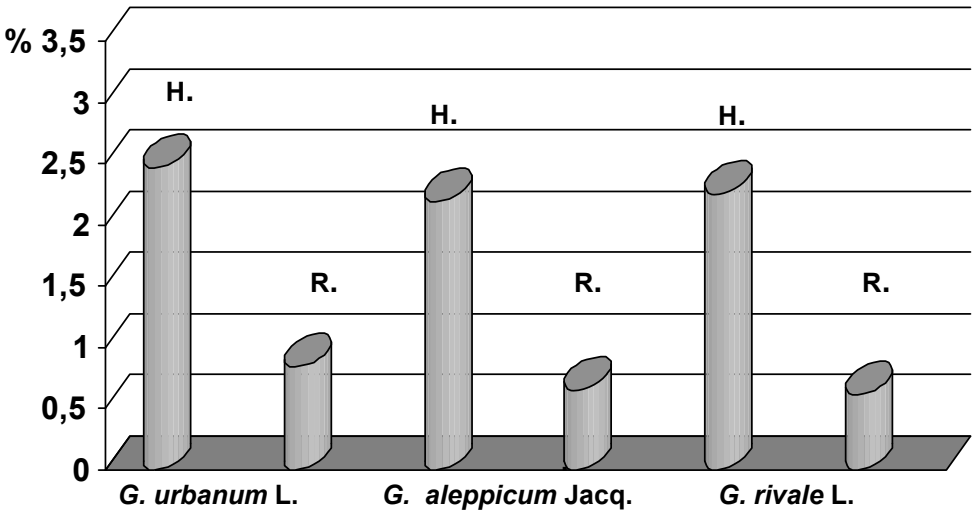
Plants of *Geum* genus (gravilat) are related to *Rosoideae* subfamily of *Rosaceae* family. 3 species: *G. aleppicum* Jacq., *G. rivale* L. and *G. urbanum* L. grow on the whole area of Ukraine and are used in the folk medicine as anti-inflammatory, cholagogue, styptic and wound healing agents [3].

According to the preliminary chemical researches it is established the presence of a considerable number of tanning agents, flavonoids, so the determination of flavonoid sums in a row material of studied species has a certain interest.

It has been taken as the investigation subjects the herb (*Herba Gei*) and the rhizome with roots (*Rhizomata cum radicibus Gei*) which were prepared in Kharkov region in 2007-2009.

It was made the spectrophotometric determination of flavonoid sums in herb and in rhizomes with roots of the 3 stuidied species of *Geum* L. genus with the re-computation to a rutin. It is applied the differential spectrophotometry method which is the most widely spread. The operating range of wavelength for flavonoids is the long-wave maximum 330-370 nm. It is appearing the shift of the first band absorption of flavonoids in the range 385-460 nm. [1,2,4].

The results of quantitative determination of flavonoids in the vegetative organs of the studied *Geum* L. genus species are presented in fig. 1.



Notes: H. – herb, R. – rhizome with roots.

Fig. 1. Quantitative determination of flavonoids sum in the plants of *Geum* L. genus.

The obtained data show that the biggest sum of flavonoids has the following herbs: *G. urbanum* L., *G. aleppicum* Jacq. and *G. rivale* L. – 2,47%, 2,19% and 2,25% respectively. Thus our results indicate the availability of a subsequent advanced pharmacognosical and pharmacological study of *Geum* L. genus plants herb.

References:

1. *Беликов В. В.* Избирательный метод анализа флавоноидов и фитохимических препаратов / В. В. Беликов, Т. В. Точкова, Н. Т. Колесник // Проблемы стандартизации и контроля качества лекарственных средств : Всес. конф., г. Москва, 18–21 дек. 1991 г. – М., 1991. – С. 13–14.
2. *Георгиевский В. П.* Физико–химические методы анализа активных веществ растительного происхождения / В. П. Георгиевский, А. Н. Казаринов, Н. О. Каррыев. – Ашхабад : Ылым, 1976. – 238 с.
3. Определитель высших растений Украины / Д. Н. Доброчаева, М. И. Котов, Ю. Н. Прокудин и др. – [2-е изд-е стереот.]. – К. :Фитосоциоцентр, 1999. – 548 с.
4. *Harborne J. B.* Advances in flavonoid research since 1992 / J. B. Harborne, C. A. Williams // Phytochemistry. – 2000. – Vol. 55, № 6. – P. 481–504.
5. *Oyvind E.* Flavonopids. Chemistry, Biochemistry and Applications / E. Oyvind, M. Andersen, R. Markham. – N-Y : CRC Press; Taylor & Francis Group, 2006. – 1212 p.

НОВЫЕ ЭКСТРАКЦИОННЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ФРУКТОЗЫ ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ

[1]Коренман Я.И., [2]Мокшина Н.Я., [1]Бычкова А.А.

[1]Государственная технологическая академия, Воронеж, Россия.
e-mail: korenman@vgta.vrn.ru
[2]Военный авиационный инженерный университет, Воронеж, Россия.
e-mail: moksnad@mail.ru

Фруктоза широко применяется в качестве подсластителя и вспомогательного компонента терапевтических средств. В связи с расширением производства и потребления диабетических продуктов, биологически активных добавок и фармацевтических препаратов необходимо совершенствовать контроль их качества и подлинности. Жидкостная экстракция остается одним из наиболее распространенных методов пробоподготовки при определении микроколичеств органических соединений разных классов.

Цель исследования состоит в разработке методики извлечения фруктозы из водных растворов смесями гидрофильных растворителей и ее последующего хроматографического определения.

Изучено межфазное распределение в системах фруктоза – алкилацетат – алифатический спирт (нормального и изомерного строения) – сульфат аммония – вода. Установлено, что при экстракции бинарными смесями растворителей количественные характеристики экстракции фруктозы выше, чем в системах с индивидуальными растворителями. Возрастание коэффициентов распределения по сравнению с аддитивными величинами обусловлено образованием смешанных сольватов фруктозы с компонентами смеси гидрофильных растворителей [1]. С увеличением длины углеводородного радикала в ряду алифатических спиртов синергетический эффект закономерно снижается. Приводим коэффициенты распределения фруктозы в системах спирт – алкилацетат (или ацетон):

состав смеси	алкилацетат, мол. доли				
	0,2	0,4	0,5	0,6	0,8
н.пропиловый спирт − этилацетат	42,9	37,6	33,4	31,4	27,0
н.бутиловый спирт − этилацетат	39,5	33,6	29,2	26,0	23,0
изопропиловый спирт − этилацетат	25,6	40,9	47,8	53,5	62,4
н.пропиловый спирт − бутилацетат	25,7	27,4	26,7	24,7	18,9
н.бутиловый спирт − бутилацетат	16,5	18,3	17,2	16,1	14,2
изопропиловый спирт − бутилацетат	36,9	35,6	33,0	28,7	20,2

При экстракции фруктозы из водно-солевых растворов смесями спирт C_3−C_6 – бутилацетат коэффициенты распределения ниже, чем при экстракции смесями спиртов с этилацетатом. Для количественной оценки синергетического эффекта рассчитаны коэффициенты синергетности.

Оптимизирован состав смесей для практически полного извлечения фруктозы. Наиболее полное извлечение фруктозы из водно-солевого раствора достигается при экстракции смесью этилацетат – ацетон – изопропиловый спирт (6 : 3 : 1), высаливатель − сульфат аммония. Объемное соотношение водного раствора фруктозы и смеси растворителей 15 : 1; продолжительность экстракции 5 мин.

Концентрат анализировали методом восходящей хроматографии в тонком слое на пластинах «Silufol^R». В качестве подвижной фазы применяли смесь этилацетат – н.пропиловый спирт − концентрированная уксусная кислота − формамид − вода. Для проявления пятен фруктозы пластины обрабатывали смесью ортофосфорной кислоты и ацетона, содержащего дифениламин и анилин; термостатировали при 100−110°С [2]. Расчет площади пятна и построение градуировочной зависимости осуществляли с применением IBM PC и офисного сканера (расчеты выполнялись в специально подготовленной программе, написанной на языке высокого уровня Delphi 7). Оптимизированы условия сканирования (цветовой режим, разрешение, фон).

По графику зависимости площади пятна от концентрации фруктозы находили ее содержание в анализируемом растворе. Методика позволяет определять фруктозу при концентрациях на уровне 1–90 мкг/см^3 с погрешностью в пределах 5–7%.

Литература

1.*Мокшина, Н.Я., Ерина, О.В., Пахомова, О.А., Савушкин, Р.В.* // Журн. физ. химии. 2007. Т. 81. № 12. С. 1964 − 1968..
2.*Кирхнер Ю.* Тонкослойная хроматография: в 2 т. М.: Мир. 1981. 616 с.

NEW EXTRACTION SYSTEM TO REMOVE FRUCTOSE FROM AQUEOUS SOLUTIONS

[1]Korenman Ya.I., [2]Mokshina N.Ya., [1]Bychkova A.A.

[1]State Technological Academy, Voronezh, Russia.
e-mail: korenman@vgta.vrn.ru
[2]Air Force Engineering University, Voronezh, Russia.
e-mail: moksnad@mail.ru

Fructose is widely used as a sweetener and an auxiliary component therapy. In connection with the expansion of production and consumption of diabetic products, dietary supplements and pharmaceuticals, control their quality and authenticity is necessary to improve. Solvent extraction is one of the most common methods of sample preparation in the determination of trace organic compounds of different classes.

The objective is to develop techniques of extraction of fructose from aqueous solutions by mixtures of hydrophilic solvents and subsequent chromatographic determination.

The interfacial distribution systems fructose - alkyl acetates - aliphatic alcohol (normal and isomeric structure) - ammonium sulphate – water has been studied. The increase in the quantitative characteristics of fructose in the extraction of binary mixtures of solvents in comparison with systems with individual solvents was found. Distribution coefficients increase compared with the additive values due to the formation of mixed fructose solvates and components of hydrophilic solvents mixture [1]. Synergistic effect with increasing length of hydrocarbon radical in a series of aliphatic alcohols are naturally reduced. Here are the distribution coefficients of fructose in alcohol systems - alkyl acetates (or acetone):

mixture	alkyl acetates, mol. share				
	0,2	0,4	0,5	0,6	0,8
n.propyl alcohol - ethyl acetate	42,9	37,6	33,4	31,4	27,0
n.buthyl alcohol - ethyl acetate	39,5	33,6	29,2	26,0	23,0
isopropyl alcohol - ethyl acetate	25,6	40,9	47,8	53,5	62,4
n.propyl alcohol - butyl acetate	25,7	27,4	26,7	24,7	18,9
n.butyl alcohol - butyl acetate	16,5	18,3	17,2	16,1	14,2
isopropyl alcohol - butyl acetate	36,9	35,6	33,0	28,7	20,2

The distribution coefficients for the extraction of fructose from aqueous salt solutions by mixtures of alcohol C_3-C_6 and butyl acetate is lower than the extraction with mixtures of alcohols with ethyl acetate. For quantitative-term evaluation of the synergistic effect synergetic coefficients are calculated.

The composition of mixtures for almost complete recovery of fructose from aqueous solution has been optimized. In extraction by mixture ethyl acetate - acetone - isopropyl alcohol (6: 3: 1), salting-out agent - ammonium sulfate, most complete removal of fructose from aqueous salt solution is achieved. Volume ratio of fructose aqueous solution and the mixture of solvent 15: 1, duration of extraction 5 min.

The concentrate was analyzed by ascending chromatography in a thin layer on plates «Silufol^R». The mixture of ethyl acetate - n.propyl alcohol - concentrated acetic acid - formamide - water as the mobile phase has been applied. To detect spots fructose plates with a mixture of phosphoric acid and acetone containing diphenylamine and aniline has been treated and thermostated at 100-110 ° C [2]. Calculation of spot area and the construction of the calibration dependence was performed using the IBM PC and the office scanner (calculations performed by specially prepared program written in a high-level language Delphi 7). Terms of scan (color mode, resolution, background) have been optimized.

According to the schedule depending on the area of spots on the concentration of fructose its content into the solution has been found. The technique allows to determine fructose concentrations at the level of trace 1-90 mkg/sm^3 with an error of 5-7%.

References:

1. Mokshina, N,Ya., Erina, O.V., Pakhomova, O.A., Savushkin, R.V. // J. phiz. chemistry. 2007. Vol. 81. № 12. P. 1964 – 1968.
2. Kirchner Yu Thin layer chromatography : in 2 v. M.: Mir. 1981. 616 p.

ЭКСТРАКЦИЯ КОФЕИНА АЛКИЛАЦЕТАТАМИ И УФ – СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ВОДНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ

[1]Коренман Я.И., [2]Мокшина Н.Я., [1]Кривошеева О.А., [1]Солохин С.А.

[1]Воронежская государственная технологическая академия, Воронеж, Россия
e-mail: korenman@vgta.vrn.ru
[2]Военный авиационный инженерный университет, Воронеж, Россия
e-mail: moksnad@mail.ru

Кофеин (1,3,7 – метилксантин) относится к группе природных пуриновых алкалоидов ксантинового ряда. Получают кофеин как из природного сырья (отходов чайного производства – чайной пыли, формовочного материала и т.п.), так и полным или частичным синтезом из мочевой кислоты и ксантина. Содержится в различных напитках, применяется в фармацевтике. В малых дозах оказывает стимулирующее воздействие на нервную систему. В связи с расширением производства лекарственных препаратов необходимо совершенствовать контроль их качества и подлинности. Задача может быть решена с применением жидкостной экстракции.

Известны коэффициенты распределения кофеина в системах с некоторыми алифатическими спиртами: они, как правило, не превышают 1,0-1,2[1] и не позволяют более или менее полно извлекать кофеин из водных растворов.

Для экстракции кофеина нами впервые применены алкилацетаты (этилацетат, бутилацетат, пентилацетат). Обязательное условие экстракции гидрофильными растворителями из водных растворов – применение высаливателя. Высаливающее действие электролитов объясняется уменьшением содержания несвязанной воды в водном растворе. Действие высаливателя зависит как от природы электролита, так и от свойств распределяемого вещества. Соли влияют на диэлектрическую проницаемость среды, ионную силу раствора, способствуют образованию двухфазной системы, повышают количественные характеристики экстракции (коэффициенты распределения D, степень извлечения R,%) [2,3]. Изучена экстракция кофеина в присутствии сульфата аммония и карбоната калия.

Для анализа водных концентратов применяли метод УФ – спектрофотомерии (спектрофотометр SHIMADZU UV MINI-1240, кварцевая кювета, *l* = 1 см, максимум светопоглощения при 272 нм).

Эффективность распределения кофеина в системах с гидрофильными растворителями определяется способностью экстрагентов образовывать с извлекаемым веществом устойчивые комплексы (сольваты, ассоциаты). С увеличением числа С–атомов в молекулах алкилацетатов их экстрагирующая способность закономерно снижается. Установлено, что наиболее эффективным экстрагентом для извлечения кофеина среди известных эфиров является этилацетат, высаливатель − сульфат аммония (n = 3, P = 0,95):

экстрагент	D	R, %
этилацетат	89,9±1,3	90,0
бутилацетат	64,8±0,8	86,6
пентилацетат	55,1±0,5	84,6

Оптимизированы условия экстракции кофеина − концентрация сульфата аммония, соотношение объемов водной и органической фаз, продолжительность экстракции, pH водного раствора. Минимально определяемые концентрации кофеина на уровне 0,5 мг/см^3.

Литература:

1. *Я.И. Коренман* Коэффициенты распределения органических соединений. Справочник. Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та. 1992. 336 с.
2. *Н. Я. Мокшина* Экстракция аминокислот и витаминов. Воронеж: Воронеж. гос. технол. акад. 2007. 246 с.
3. Основы жидкостной экстракции / Под ред. Г.А. Ягодина. М.: Химия. 1981. 400 с.

EXTRACTION OF CAFFEINE ALKYL ACETATES AND UV-SPECTROPHOTOMETRIC DETECTION WATER CONCENTRATE

[1]Korenman Ya.I., [2]Mokshina N.Ya., [1]Krivosheeva O.A., [1]Solokhin S.A.

[1]Voronezh State Technological Academy, Voronezh, Russia,
e-mail: korenman@vgta.vrn. ru
[2]Air Forse Engineering University, Voronezh, Russia
e-mail: moksnad@mail.ru

Caffeine (1,3,7 - methylxanthine) refers to a group of natural purine alkaloids xanthine series. Caffeine is obtained both from natural raw materials (waste tea production - the tea dust, mold material, etc.) as well as a complete or partial synthesis of uric acid and xanthine. Contained in various drinks, used in pharmaceuticals. In small doses, stimulates the nervous system. In connection with the expansion of drug production is necessary to improve their quality control and authenticity.

Known distribution coefficients of caffeine in the system with some aliphatic alcohols of not more than 1.20 [1] and do not allow more or less fully to extract caffeine from water solutions.

For extraction of caffeine, we first applied alkiatsetaty (ethyl acetate, butyl acetate, amyl atsetat). Mandatory condition of extraction with hydrophilic solvents from water solutions, application electrolyte. Salting-out effect of electrolytes due to the reduction of free water in aqueous solution. Effectiveness of the electrolyte depends on the nature of the electrolyte, and the properties of distributed matter. Salt effect on the dielectric constant of the medium, ionic strength, promote the formation of two-phase system, increase the extraction of quantitative parameters (distribution coefficients, the degree of extraction) [2,3]. The extraction of caffeine in the presence of ammonium sulphate and potassium carbonate.

For the analysis of water concentrates the UV method – spectrophotometric (spectrophotometer SHIMADZU UV MINI-1240, a quartz cuvette, l = 1 cm, the maximum absorbance at 272 nm) was used.

Efficiency of distribution of caffeine in systems with hydrophilic solvents on the ability of the extractive solvent to form with the material extracted stable complexes (solvates associates). In a series of alkyl acetates with an increase in the number of C atoms in the molecules of extractive solvent capacity naturally decreases. most effective extractant for the extraction of caffeine among known ester is ethyl acetate, salting-out agent - ammonium sulfate (n = 3, P = 0,95) was found:

extractive solvent	D	R,%
ethyl acetate	89,9 ± 1,3	90,0
butyl acetate	64,8 ± 0,8	86,6
amyl atsetat	55,1 ± 0,5	84,6

Conditions for extraction of caffeine - the concentration of ammonium sulfate, the volume ratio of aqueous and organic phases, the duration of extraction, pH of the water solution were optimized. The minimum detectable concentration of caffeine at the level of 0.5 mg/cm^3.

References:

1.*Korenman Ya.I* .The distribution coefficients of organic compounds. Directory.Voronezh: Izd. Voronezh. state. Univ. 1992. 336.
2.*Mokshina N.Ya.* Extraction of amino acids and vitamins. Voronezh: Voronezh. state.Tekhnol. Acad. 2007. 246.
3.Fundamentals of solvent extraction, ed. G.A. Jagodin. Moscow: Chemistry. 1981. 400 pp.

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ИЗ СОЛОМЫ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР

Кравец А.В., Касимова Л.В., Бобровская Д.Л.

ГНУ Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства и торфа Россельхозакадемии, Томск, Россия
e-mail: sibniit@mail.tomsknet.ru

Солома злаковых культур может служить источником получения биологически активных веществ, благодаря наличию в ней макро-, микроэлементов, аминокислот и витаминов. Цель работы – исследовать биологическую активность новых препаратов из соломы в лабораторных опытах.

Выделение БАВ проводили щелочным гидролизом пшеничной соломы по методике Л.В.Касимовой [1] с использованием разных щелочных реагентов (NH_4OH, NaOH, KOH). В 100г препарата (Солома+NH_4OH) содержится 170мг минерального азота, 11мг фосфора и 191мг калия, pH =7,6, содержание сухой органической массы (ОМ) 4,6%. Препарат (Солома+NaOH) содержит 32,5мг азота, 14,7мг фосфора, 92,9мг калия, pH= 13,4, концентрация 2,7%ОМ. Препарат (Солома+KOH) содержит 8,3мг азота, 20,8мг фосфора, 965мг калия, pH=7,0, концентрация 2,5%ОМ. Препараты представляют собой жидкости темно-коричневого цвета со специфическим запахом. Поскольку выделенные органические вещества мы не можем однозначно идентифицировать и определить действующее вещество, показателем концентрации раствора служила сухая органическая масса. Растворы применяли в широком интервале концентраций: 1,0%-0,007%ОМ.

Оценка биологической активности препаратов включала два способа применения: обработка семян пшеницы [2] и выращивание пшеницы на испытуемых растворах методом «водных культур» [3]. Метод водных культур позволяет найти оптимальные концентрации препаратов для опрыскивания вегетирующих растений и корневой подкормки. Учитывали показатели всхожесть и прирост сухой вегетативной и корневой массы 7-дневных растений. Контролем служил вариант с обработкой семян водой или выращиванием проростков пшеницы на воде. В опытах использовали семена пшеницы сорта Новосибирская-15.

Для каждого исследованного препарата выявлены концентрации, повышающие всхожесть на 4-11%. При этом в опытных вариантах увеличилась вегетативная масса на 5-7%, корневая на 5-11%. В целом по стимулирующей активности препараты можно выстроить в ряд по мере убывания: (Солома+KOH), (Солома+NH_4OH), (Солома+NaOH). Возможно, это связано с уровнем кислотности исходного препарата.

Исследования методом «водных культур» показали, что максимально достоверное увеличение вегетативной массы проростков пшеницы на 17-24% к контролю обеспечил препарат (Солома+KOH) в интервале концентраций 0,1-0,007%ОМ. Препарат (Солома+NaOH) увеличил вегетативную массу пшеницы на 4-21%. Наибольшее и достоверное повышение выявлено в концентрации 0,04%ОМ. Менее эффективным оказался препарат (Солома+NH_4OH), достоверно повысив сухую вегетативную массу на 17% к контролю в концентрации 0,5%ОМ. Эти концентрации растворов могут быть рекомендованы для опрыскивания вегетирующих растений.

Максимально и достоверно положительное (+11% к контролю) влияние на нарастание массы корней проростков пшеницы обеспечил препарат (Солома+KOH) в концентрации 0,007%ОМ. Данная концентрация препарата может быть рекомендована в составе корневой подкормки.

Мы предполагаем, что высокая физиологическая активность полученных препаратов обусловлена присутствием в них гуминоподобных веществ.

Полученные результаты позволили определить наиболее эффективные концентрации для двух способов применения препаратов из соломы. Дешевизна, повсеместность и доступность соломы обуславливает перспективность применения данных препаратов.

Литература:

1.Патент РФ 2213452, МКИ 7 AOI N 65/00. Способ получения стимулятора роста растений /Л.В.Касимова. - Опубл. 10.10.2003, бюл. №28.
2.ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. - М.: Издательство стандартов, 1984. - 28с.
3.*Прянишников Д.Н.* Избранные сочинения в трех томах. Т.2. Частное земледелие:- М: Изд-во «Колос», 1965.-70 с.

BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM STRAW OF CEREALS

Kravets A.V., Kasimova L.V., Bobrovskaya D.L.

SSI Siberian Research Institute of Agriculture and peat RAAS, Tomsk, Russia
e-mail: sibniit@mail.tomsknet.ru

The straw of cereals can be a source of biologically active substances, due to the presence of macro, micronutrients, amino acids and vitamins. The purpose of the work is to investigate the biological activity of new preparations from the straw in laboratory experiments.

Separation of biologically active substances was performed by alkaline hydrolysis of wheat straw by the method of L.V. Kasimova [1], by using a different alkaline reagents (NH_4OH, NaOH, KOH). The 100g of the preparation (Straw + NH_4OH) contains 170mg of mineral nitrogen, 11mg of phosphorus and 191mg of potassium, pH 7,6, with the content of dry organic matter (OM) 4,6%. Preparation (Straw + NaOH) contains 32,5mg of nitrogen, 14,7mg phosphorus, 92,9mg of potassium, pH 13,4, with the concentration of 2,7%OM. Preparation (Straw + KOH) contains 8,3mg of nitrogen, 20,8mg of phosphorus, 965mg potassium, pH 7,0, with the concentration of 2,5%OM. All the above preparations are liquids of a dark brown color with a specific odor. Since we can't uniquely identify all organic substances and define the active ingredient. So the dry organic matter concentration was chosen as a standard of concentration of the preparation. Preparation were used in a wide range of concentrations: 1,0% - 0,007%OM.

Two methods of application were used for the assessment of biological activity of preparations: pretreatment of wheat seeds [2] and the cultivation of wheat in the test solution by the method of "water cultures" [3]. The method of "water culture" allows as to find the optimal concentrations of preparations for the spraying of vegetating plants and root feeding. The defining factors were: the germinating capacity and growth rate of vegetative and root parts, estimated by dry weight of 7-days old plants. The processing of the seeds in water or growing wheat seedlings in water- served as controls in experiments. In the experiments we used seeds of the cultivar Novosibirsk-15.

For different concentrations of each and every preparation the experiment revealed the increase of germination rate in the range of 4 to 11%. It was found as well: the increase of vegetative mass by 5 - 7% and the root mass by 5 – 11%. In general, according the stimulating activity preparations can be arranged in descending order: (Straw + KOH), (Straw + NH_4OH), (Straw + NaOH). In our consideration due to the level of acidity of the original preparation.

Investigations by the method of "water culture" revealed that most significant increase in vegetative mass of wheat seedlings was shown by a preparation (Straw + KOH) in the concentration range of 0,1% to 0,007%OM. The increase of vegetative mass was from 17% to 24% in comparing with control and correlated to concentration of solution. The experiment with a preparation (Straw + NaOH) showed the increase in vegetative mass of wheat of 4 - 21%. The highest and significant increase detected at a concentration of 0,04%OM. Less effective was the preparation (Straw + NH_4OH), significantly increased the dry vegetative mass at 17% of control at a concentration of 0,5% OM. These concentrations of solutions can be recommended for spraying of vegetating plants.

Maximally and significantly positive (+11% to a control) effect on the growth of the mass of the roots of wheat seedlings provided by a preparation (Straw + KOH) at a concentration of 0,007%OM. This concentration of the preparation can be recommended as part of a root feeding.

We assume that a high physiological activity of these preparations is due to the presence of humus-like substances.

The results obtained, allowed to determine the most effective concentrations for each of two ways of use of a straw preparations. Introduction of a straw preparations in agriculture is highly promising because of a low cost, ubiquity and availability of straw.

References:

1. RF Patent 2213452, MKI 7 AOI N 65/00. Process for obtaining a plant growth stimulator / L.V. Kasimova. - Publ. 10.10.2003, bull. № 28.
2. State Standard 12038-84. Seeds of agricultural crops. Methods of determination of the germination ratio. - Moscow: Publishing Office of Standards, 1984 .- 28c.
3. *Pryanishnikov D.N.* Selected Works in three volumes. T.2. Private Agriculture: - M.: publishing office "Kolos ", 1965.-70.

ВИВЧЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ДУБИЛЬНИХ РЕЧОВИН ТА ОКИСЛЮВАЛЬНИХ ФЕНОЛІВ У ВЕГЕТАТИВНИХ ТА ГЕНЕРАТИВНИХ ОРГАНАХ РОСЛИН РОДУ *DUSCHEKIA* OPIZ

Кулагіна М.А., Козира С.А., Радько О.В., Сербін А.Г.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна
e-mail: kulaginamariya@mail.ru

Надзвичайно актуальною, з точки зору питання раціонального використання відомих лікарських рослин, залишається проблема їх комплексної переробки, а також пошук додаткових джерел природних біологічно активних сполук з метою розширення номенклатури офіцинальних лікарських рослин та сировинної бази. До представників роду *Duschekia* родини *Betulaceae* належить душекія зелена – *Duschekia viridis* (Chaix) Opiz, яка розповсюджена в Західній Україні, де займає від 4% до 6% загальної площі високогір'я Українських Карпат. Також до цього роду належать душекія Максимовича – *Duschekia maximowiczii* (Call.) Pouzar і душекія чагарникова – *Duschekia fruticosa* (Rupr.) Pouzar, які у дикому стані зростають поза межами України. Види роду *Duschekia* широко використовуються в народній медицині як протизапальний, в'яжучий та кровоспинний засоби.

За об'єкти дослідження були обрані кора, листя та супліддя трьох видів душекії, які були заготовлені у 2006-2008 рр. в ботанічних садах України та в Українських Карпатах. Завдяки попереднім хімічним дослідженням нами було встановлено, що рослини роду *Duschekia* містять дубильні речовини та поліфенольні сполуки.

Для визначення кількості дубильних речовин в вегетативних та генеративних органах вивчаємих видів роду душекія використовували метод Левенталя-Нейбауера. Оскільки відомо, що цей фармакопейний метод має ряд недоліків, а саме: здатність перманганату окислювати й інші природні сполуки; нечіткий перехід забарвлення розчинів при титруванні; ступінь розведення розчинів, що титруються; різна залежність точності результатів від розрахункового коефіцієнта у певних груп фенольних сполук рослин тощо, – ми визначили кількісний вміст суми окислювальних фенолів. А для визначення дубильних речовин – додатково використали більш специфічний комплексонометричний метод [ДОСТ 4565-79], який базується на здатності цих речовин утворювати осад із солями важких металів. Отримані дані наведені в таблиці.

Таблиця: Кількісний вміст дубильних речовин та окислювальних фенолів у корі, листі і супліддях видів роду *Duschekia*

Вид	Сировина	Вміст окислювальних фенолів, %*	Вміст дубильних речовин, %*
		Перманганатометрія	Комплексонометрія
D. viridis	Кора	29,14±0,16	4,75±0,14
	Листя	11,81±0,15	4,50±0,13
	Супліддя	15,42±0,18	8,19±0,02
D. maximowiczii	Кора	17,32±0,25	2,59±0,13
	Листя	11,50±0,18	3,86±0,10
	Супліддя	17,68±0,18	11,21±0,03
D. fruticosa	Кора	11,14±0,16	3,00±0,09
	Листя	14,49±0,20	4,34±0,10
	Супліддя	13,35±0,12	8,97±0,02

Примітка: * – n = ,6 у перерахунку на абсолютно суху сировину, %

Одержані результати свідчать, що вміст дубильних речовин в корі та супліддях д. зеленої і д. Максимовича перебільшує ці показники у листі, а кількість дубильних речовин в листі д. чагарникової, навпаки більша, ніж у корі та супліддях. Таким чином, за вмістом дубильних речовин у листі (4,5-17,3%) та супліддях (8,2-17,6%) душекію зелену, д. Максимовича і д. чагарникову можна віднести до танідоносної рослинної сировини.

STUDYING OF THE QUANTITATIVE CONTENT OF TANNING AGENTS AND OXIDIZABLE PHENOLS IN VEGETATIVE AND GENERATIVE ORGANS OF *DUSCHEKIA* OPIZ GENUS PLANTS

Kulagina M.A., Kozyra S.A., Radko E.V., Serbin A.G.

National pharmaceutical university, Kharkov, Ukraine
e-mail: kulaginamariya@mail.ru

The problem of complex processing of well-known medicinal plants remains to be very topical from the point of view of their rational exploitation. The same is related to the problem of finding of additional sources for natural biologically active substances with the aim of nomenclature extension of officinal medicinal plants and row material base. До представників роду *Duschekia* родини *Betulaceae* належить душекія зелена – *Duschekia viridis* (Chaix) Opiz, яка розповсюджена в Західній Україні, де займає від 4% до 6% загальної площі високогір'я Українських Карпат. Також до цього роду належать душекія Максимовича – *Duschekia maximowiczii* (Call.) Pouzar і душекія чагарникова – *Duschekia fruticosa* (Rupr.) Pouzar, які у дикому стані зростають поза межами України. Види роду *Duschekia* широко використовуються в народній медицині як протизапальний, в'яжучий та кровоспинний засоби.

It has been taken as the subjects of study the cortex, leaves and infructescences which were prepared in botanic gardens of Ukraine and in Ukrainian Carpathians in 2006-2008. Our previous chemical investigations showed that plants of *Duschekia* genus contain tanning agents and polyphenol substances.

It has been used the Leventhal-Neibauer method for determination of a tanning agents content in vegetative and generative organs of studied species of *Duschekia* genus. As it is known that this pharmacopeia method has several shortcomings, notably: the ability of permanganate to oxidize additionally other natural substances, a fuzzy changeover of solution coloring at the titration, the rate of dilution of titrating solutions, different dependences of results precision on a design factor of certain groups of plant phenol substances; we determined at first the quantitative content of oxidizable phenol sum. For the more precise determination of tanning agents we applied additionally more specific chelatometric method (DOST 4565-79) based on the ability of these substances to deposit with salts of heavy metals. The obtained data are in the table.

Table:Quantitative content of tanning agents and oxidizable phenols in cortex, leaves and infructescences of species of *Duschekia* genus

Species	Row materiala	The content of oxidizable phenols, %*	The content of tanning agents, %*
		Permanganatometry	Chelatometry
D. viridis	Cortex	29,14±0,16	4,75±0,14
	Leaves	11,81±0,15	4,50±0,13
	Infructescences	15,42±0,18	8,19±0,02
D. maximowiczii	Cortex	17,32±0,25	2,59±0,13
	Leaves	11,50±0,18	3,86±0,10
	Infructescences	17,68±0,18	11,21±0,03
D. fruticosa	Cortex	11,14±0,16	3,00±0,09
	Leaves	14,49±0,20	4,34±0,10
	Infructescences	13,35±0,12	8,97±0,02

Notes: * – n = ,6 with recalculation in an absolutely dry substance, %

The obtained results show that the content of tanning agents in the cortex and infructescences (8,2-17,6%) of *Duschekia viridis* and *Duschekia maximowiczii* exceeds the same factors in leaves. Oppositely, the content of tanning agents in leaves of *Duschekia fruticosa* is bigger than in the cortex and infructescences. Thus, by the content of tanning agents in leaves (4,5-17,3%) *D. viridis*, *D. maximowiczii* and *D. fruticosa* can be related to tannin plant row material.

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕНЫХ ТРИТИЕМ ПРИРОДНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НЕСТЕХИОМЕТРИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ И ПЕРЕМЕННОГО СОСТАВА: ПЕРСПЕКТИВЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

[1,2]Куликова Н.А., [1]Чернышева М.Г., [1]Бадун Г.А., [3]Цветкова Е.А., [1]Константинов А.И., [1]Коробков В.И., [1]Кляйн О.И., [2]Степанова Е.В., [2]Королева О.В., [1]Перминова И.В.

[1]Московский государственный университет им. Ломоносова, Москва, Россия
e-mail: masha.chernysheva@gmail.com
[2]Институт биохимии им. Баха РАН, Москва, Россия
[3]Институт органической химии им. Зелинского РАН, Москва, Россия

Необходимым этапом внедрения в практику нового лекарственного средства являются его клинические исследования. Клинические исследования лекарственных препаратов представляют собой весьма дорогостоящие испытания, требующие участия больших групп людей: от 20-80 человек на I фазе до 1000-3000 на III фазе. Поэтому в последнее время все большую актуальность приобретают изыскания, направленные на характеристику потенциальных лекарственных препаратов с помощью физико-химических методов и компьютерного моделирования. Такие принципы исследования лекарственных средств хорошо применимы к препаратам с известной структурой и установленным механизмом действия и нашли широкое использование при предварительном скрининге лекарств. В тоже время практически не разработаны принципы изучения и оценки лекарственных средств природного происхождения, интерес к которым в последнее время значительно возрос. Особенностью лекарственных средств природного происхождения является их сложный химический состав и одновременное присутствие нескольких биологически активных веществ, обуславливающих фармакологический эффект.

Наиболее сложным с точки зрения химической неоднородности природным лекарственным сырьем являются гуминовые вещества (ГВ) – действующее начало медицинского действия сапропеля, торфа, мумие. Они представляют собой органические соединения, к фундаментальным свойствам которых относятся нестехиометричность состава, нерегулярность строения, гетерогенность структурных элементов и полидисперсность. В настоящее время на основе ГВ уже созданы и нашли применение такие лекарственные препараты как торфот, ТРР, гумизоль, пелоидин, ФиБС, эприл и др. Несмотря на доказанную медицинскую эффективность этих препаратов, механизм действия ГВ не известен, что вызвано, в первую очередь, отсутствием разработанных принципов исследования лекарственных средств на основе природного сырья. Основным препятствием, возникающим на пути исследователей, является отсутствие способов определения ГВ на фоне органических веществ самих живых организмов.

Целью предлагаемой работы является оценка возможности использования меченых тритием препаратов ГВ для изучения их поведения в биологических исследованиях. Получение препаратов проводили согласно [1].

С использованием предлагаемого подхода была проведена количественная оценка взаимодействия ГВ с грамотрицательными бактериями (на примере *Escherichia coli*), растениями (на примере пшеницы *Titicum aestivum* L.) грибами (на примере *Trametes maxima*), а также осуществлена количественная оценка такого важного с точки зрения биологической активности свойства как гидрофобность. На примере растений была показана возможность использования тритиевой авторадиографии для оценки распределения ГВ в организмах.

Было установлено, что ГВ можно отнести к гидрофильным соединениям: октанольно-водный коэффициент для них варьировался в диапазоне от –2.98 до –1.95. Количество ГВ, поглощаемых различными биологическими объектами, составило 45-655, 105-140 и 200-900 мг/кг для бактерий, грибов и растений соответственно. При этом большая часть ГВ адсорбировалась клеточной поверхностью, тогда как во внутриклеточное пространство в среднем поступало только около 10% ГВ. На примере ГВ была показана перспективность использования меченых тритием препаратов для изучения поведения природных биологически активных соединений нестехиометрического строения и переменного состава в биологических системах.

Работа подготовлена при финансовой поддержке ГК П211 в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.

Литература:

1. Badun G.A., Chernysheva M.G., Tyasto Z.A., Kulikova N.A., Kudryavtsev A.V., Perminova I.V. A new technique for tritium labeling of humic substances. 2010. Radiochim. Acta, 98:161-166

LABELING NATURAL PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF NON-STOICHIOMETRIC STRUCTURE AND HETEROGENIC COMPOSITION WITH TRITIUM: PROSPECTS FOR BIOLOGICAL STUDIES

[1,2]Kulikova N.A., [1]Chernysheva M.G., [1]Badun G.A., [3]Tsvetkova E.A., [1]Konstantinov A.I., [1]Korobkov V.I., [1]Klein O.I., [2]Stepanova E.V., [2]Koroleva O.V., [1]Perminova I.V.

[1]Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
e-mail: masha.chernysheva@gmail.com
[2]Bach Institute of Biochemistry of RAS, Moscow, Russia
[3]Zelinskii Institute of Organic Chemistry of RAS, Moscow, Russia

Before introduction of a new medical product into medical practice the product under consideration must be clinically tested. Clinical trials however are extremely expensive and involve a great body of men varying from 20-80 to 1000-3000 during phase I and phase II respectively. Therefore, pioneering aimed to characterize would-be medical products using physical-chemical methods and computer modeling is of great urgency. Such an approach is suitable very well for the preparations of established mode of action and is used on a large scale for drug preliminary screening. Principles of study and assessment of medical products of natural origin have not been yet well developed. The main peculiarity of medical products of natural origin is their complex chemical composition and simultaneous presence of several biologically active substances determining pharmacological effects.

Humic substances (HS) which are active principle of sapropel, peat, and mumijo are the most complex natural medical raw materials in terms of their chemical composition. HS are organic compounds possessing non-stoichiometric structure, irregular composition, high heterogeneity of structural elements, and polydispersity. At present many humic-based medical products are commercially available such as Torfot, Gumisol, Peloidin, FiBS, epril and others. In spite of confirmed medical efficiency of the mentioned medicines, the mechanism of HS action is still unclear because of absence developed approaches of natural remedies investigation. The main hindrance making difficult study of HS in organisms is a lack of HS determination methods in the presence of the other organic substances presented in biota.

Our study was aimed to estimate possibility of a study of HS behavior in living organisms using tritium labeled preparations obtained according (1).

A quantitative estimation of HS interaction with gram-negative bacteria (on the example of *Escherichia coli*), higher plants (on the example of wheat *Titicum aestivum* L.), and fungi (on the example of *Trametes maxima*) has been performed. Additionally, HS were characterized in terms of their hydrophobicity which is known to be a very important characteristic from biological activity point of view. An applicability of tritium autoradiography to visualize HS distribution has been demonstrated using plants as a target object.

HS have been established to be hydrophilic compounds having octanol-water distribution coefficient varying from –2.98 to –1.95. Amounts of HS accumulated by biological organisms under study were estimated as 45-655, 105-140 и 200-900 mg/kg for bacteria, fungi, and plants respectively. At that major part of HS were adsorbed by cell surface whereas only about 10% of HS were found in the intracellular space. The future prospects of the tritium labeled preparations usage for the studies of biologically active substances of non-stoichiometric structure and heterogenic composition has been demonstrated on the example of humic substances.

This research was supported by a grant from the Ministry of Education and Science of Russian Federation (GK P211).

***References*:**

1. *Badun G.A., Chernysheva M.G., Tyasto Z.A., Kulikova N.A., Kudryavtsev A.V., Perminova I.V.* A new technique for tritium labeling of humic substances. 2010. Radiochim. Acta, 98:161-166

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА ТОРФА

[1]Малиновская Л.А., [1]Кириллова М.Е., [2]Дерябина В.И.

[1]Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства и торфа Россельхозакадемии, Томск, Россия
e-mail: malinovska33@mail.ru
[2]Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, Россия
e-mail: dvitomsk@rambler. ru

В настоящее время актуальной проблемой является разработка и использование биологически активных веществ природного происхождения, отличающихся низкой токсичностью и широким спектром действия. В качестве ценного сырьевого источника таких веществ выступает продукт частичного распада болотных растений - торф.

Торф содержит широкий класс органических соединений (битумы, углеводы, гуминовые вещества, органические кислоты, фенольные соединения, ферменты, спирты, аминокислоты), основные элементы питания растений (N, P, K), макроэлементы (Ca, Mg, Fe), микроэлементы (Mn, Zn, Co, Mo, Cu), стимуляторы роста, витамины, антибиотики.

Специфическую и наиболее существенную в количественном отношении группу биологически активных веществ торфа представляют гуминовые вещества, которые нельзя получить из другого (негумифицированного) сырья растительного или животного происхождения.

В последние годы отмечается повышенный интерес к гуминовым кислотам (ГК) торфа. В результате исследований учёными установлено, что ГК (см. рис.) обладают антиоксидантной, антигрибковой активностью, адаптогенными, противоопухолевыми, радиопротекторными, антимутагенными свойствами. Биологическую активность ГК связывают с влиянием на окислительно-восстановительные процессы и активацию ферментных систем организма.

Кроме того, ГК торфа, в отличии от ГК других каустобиолитов, характеризуются отсутствием в их составе фракции серых ГК. Бурые ГК, характерные для торфов, биохимически менее устойчивы. Поэтому органические удобрения на основе торфа быстрее разлагаются, чем почвенный гумус и углегуминовые удобрения [1].

Целью наших исследований стало выявление наиболее перспективных видов торфов Западной Сибири в отношении содержания биологически активных веществ.

В ходе исследований установлено влияние ботанического состава торфа на физико-химические свойства и биологическую активность его соединений.

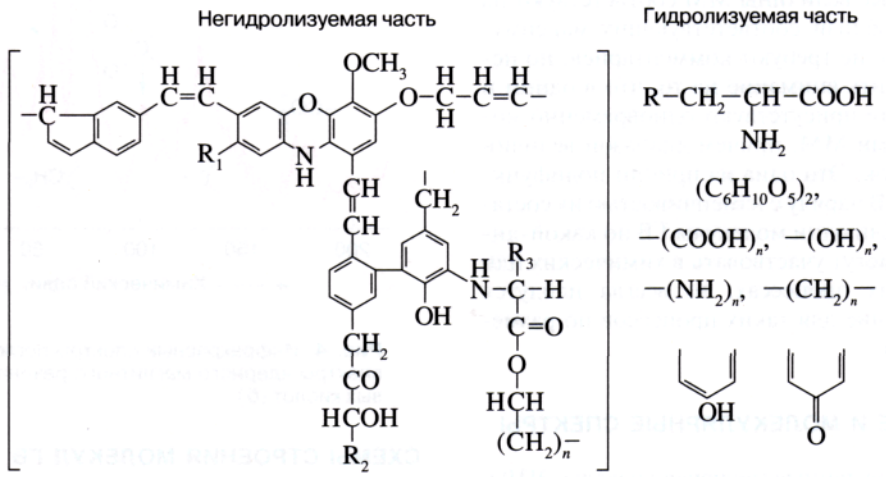


Рис. Гипотетическая формула гуминовой кислоты по Д.С. Орлову

Литература:

1.*И.И. Лиштван, Н.Н. Бамбалов, А.В. Тишкович, В.П. Стригуцкий, В.Г. Шныриков.* // Гуминовые вещества торфа и их практическое использование — Химия твердого топлива, 1990, №6, с. 14-20

BIOLOGICALLY PEAT ACTIVE MATERIALS

[1]Malinovskaja L.A., [1] Kirillova M. E., [2] Derjabina V. I.

[1]Siberian scientific research institute of agriculture and peat of the Russian agricultural academy, Tomsk, Russia
e-mail: malinovska33@mail.ru
[2] National exploratory Tomsk polytechnical university, Tomsk, Russia
e-mail: dvitomsk@rambler.ru

Now an actual problem is working out and use biologically active materials of the connatural parentage, different low toxicity and a wide action spectrum. As a valuable raw source of such materials the product of particulate disintegration of helads - peat acts.

Peat contains a wide class of organic compounds (bitumens, carbohydrates, humin substances, organic acids, phenolic bonds, ferments, alcohol, amino acids), basic elements of a food of plants (N, P, K), macronutrients (Ca, Mg, Fe), trace elements (Mn, Zn, Co, Mo, Cu), growth-promoting factors, vitamins, antibiotics.

Specific and the most essential in a quantitative sense the bunch biologically peat active materials is represented by humin substances which cannot be received from other (not humified) raw materials of vegetative or animal parentage.

Last years heightened interest to humic acids (HA) peat is marked. As a result of researches by scientists it is positioned that HA possess antifungic activity, antineoplastic, antimutagen properties et al. Biological potency HA bind to influence on oxidation-reduction processes and activation of ferment systems of an organism.

Besides, HA peat, in difference from HA other caustobioliths, are characterised by absence in their composition of fraction grey HA. Brown HA, characteristic for peat, biochemical are less steady. Therefore organic fertilizings on the basis of peat decay faster, than soil humus and humic fertilizers coal [1].

Revealing of the most perspective kinds of peat of Western Siberia concerning the maintenance biologically active materials became the purpose of our researches.

During researches influence of botanic composition of peat on physical and chemical properties and a biological potency of its bonds is positioned.

Not hydrolyzed part the Hydrolyzed part

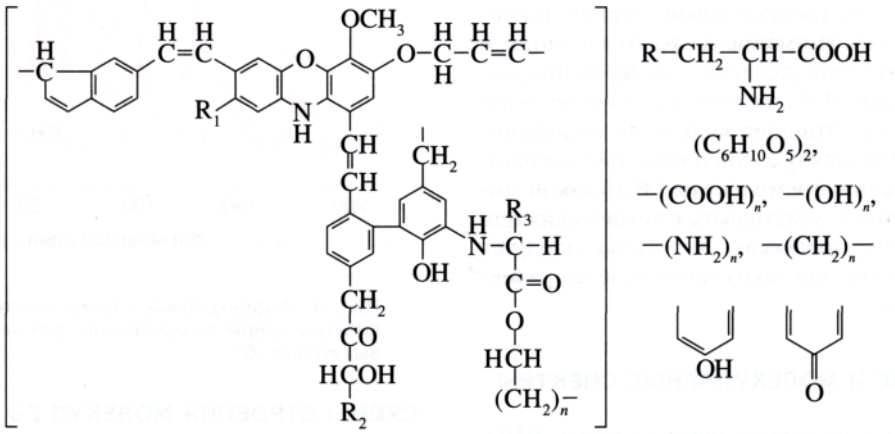


Fig. the Hypothetical formula of humic acid on D.S.Orlovu

References

1.I.*I. Lishtvan, N.N.Bambalov, A.V.Tishkovich, V.P.Strigutsky, V.G.Shnyrikov.//*Humin substances of peat and their practical use — Chemistry of firm fuel, 1990, №6, p. 14-20.

ПОЛИФРУКТАНЫ В РАСТЕНИЯХ ЦИКОРИЯ CICHORIUM INTYBUS L. В КУЛЬТУРЕ IN VITRO И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

[1]Матвеева Н.А., [1]Кваско Е.Ю., [2]Полтавская О.А., [2]Коваленко Н.К.

[1] Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: joyna56@gmail.com
[2] Институт микробиологии и вирусологии им. академика Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина

Фруктаны - полисахариды, молекула которых состоит из остатков D-фруктозы. В растительных клетках эти соединения накапливаются в вакуолях и служат в качестве запасного продукта, осморегулятора и антифриза. Фруктаны синтезируются в высших растениях, зеленых водорослях и бактериях. Согласно модели Эдельмана и Джеффорда [1] биосинтез фруктанов в растениях происходит в два этапа с участием последовательно ферментов сахарозо:сахарозо-фруктозилтрансферазы и фруктан:фруктан-фруктозилтрансферазы. К фруктанам относится инулин – запасной полисахарид цикория. Молекула инулина (C6H10O5)n содержит остатки фруктозы, соединенные между собой β-2,1-глюкозидными связями, и терминальную молекулу глюкозы [2]. Инулин служит сырьем для промышленности, например, для получения фруктозы, спирта, а также технологическим ингредиентом в производстве пищевых продуктов (йогуртов, мороженого). Полифруктаны (ПФ) обладают лечебными свойствами. Так, инулин выполняет функцию сорбента, связывая и выводя из организма токсичные вещества; способствует восстановлению нормальной микрофлоры кишечника (пребиотическая активность); нормализует обмен кальция и магния, липидов. Фруктаны, в том числе инулин, используют как диетическую добавку при нарушениях углеводного обмена, для лечения дисбактериозов, диабета, сердечно-сосудистых заболеваний.

Растения, культивируемые *in vitro*, являются моделью, на которой можно изучать особенности биосинтеза ПФ. Нами изучено влияние состава среды (макроэлементов, фитогормонов) на содержание ПФ в растениях цикория. Материал для исследований - растения цикория C. intybus сорта Пала росса, а также модифицированные растения цикория с геном интерферона-α2b [3], которые культивировали в стерильных условиях на агаризованной среде Мурасиге и Скуга (MS) [4], MS с вдвое уменьшенной концентрацией макроэлементов (1/2MS) и на тех же средах с добавлением 0,5 мг/л индолилмасляной кислоты (MS-ИМК и 1/2 MS-ИМК). Содержание полифруктанов определяли по методике [5].

Максимальная концентрация ПФ наблюдалась при росте растений на среде 1/2 MS-0,5ИМК, минимальная - на среде MS. Так, двукратное уменьшение концентрации макроэлементов увеличивало содержания инулина с 17 до 32 мг/г сухой массы корней, а добавление к среде MS 0,5 мг/г ИМК - до 56 мг/г. Уменьшение вдвое концентрации макроэлементов и добавление к среде 0,5 мг/л ИМК приводило к пятикратному увеличению содержания полифруктанов – до 92 мг/г сухой массы корней.

Содержание ПФ в модифицированных растениях оказалось значительно выше, чем в исходных и составило на среде 1/2MC через 45 суток до 388 мг/г сухой массы корней. Это можно объяснить особенностями растений, инфицированных Agrobacterium rhizogenes [6].

По предварительным данным, екстракт из корней растений цикория (содержащий ПФ) обладает биологической активностью, способствуя росту бактерий Bifidobacterium sp.

Литература:

1. *J.Edelman, T.G. Jefford.* The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in Helianthus tuberosus // New Phytol., 1968, Vol. 67, P. 516-531.
2. *Van den Ende, W., A.Michiels, J. De Roover, A. Van Laere*. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of functional genes throughout chicory development. //Sci. World J. – 2002, vol. 11, № 2, P. 1273–1287.
3. *Н.А.Матвєєва, А.М.Шаховський, О.Ю.Кваско та ін.* Cichorium intybus L. як перспективний об'єкт генетичної інженерії//Фактори експериментальної еволюції. Збірник наукових праць. Т.7. – Київ, логос. – 2009. – С. 236-241.
Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Physiol Plant. – 1962. – vol.15, № 3. – P. 473–496.
4. *А.И.Ермаков, В.В.Арасимович, Н.П. Ярош и др.* Методы биохимического исследования растений. - Л.:Агропромиздат, 1987. - С.143.
Wang, G.
5. "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Zhang%20G%22%5BAuthor%5D"
6. *Chen L., Zhang Y.* Genetic transformation of Echinacea purpurea with Agrobacterium rhizogenes and bioactive ingredient analysis in transformed cultures // Colloids and surfaces. B, Biointerfaces." Colloids Surf. B Biointerfaces. – 2006. – Vol. 53, № 1. – P.101-104.

POLIFRUCTANS OF CHICORY CICHORIUM INTYBUS L. IN IN VITRO CULTURE AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY

[1]Matvieieva N.A., [1]Kvasko E.J., [2]Poltavskaja O.A., [2]Kovalenko N.K.

[1] Institute of cell biology and genetic engineering NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine,
e-mail: joyna56@gmail.com
[2] Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine

Polifructans (PF) are a carbohydrates, polymers of fructose. In plant cells this compounds collects in vacuols as a reserve product, osmoregulator and antifreeze. Fructans are widely distributed in the plants kingdom. They are presents in monocotyledons, dicotyledons, in green algae and bacteria. According to Edelman and Jefford model [1] fructans biosynthesis in plants occurs in two stages according to participation consistently enzymes sucrose:sucrose-fructosyltransferase and fructan:fructan-fructosyltransferase. Inulin - fructan which used as a means of storing energy in chicory. The inulin molecule (C6H10O5)n consist from the fructose units joined by β(2→1) HYPERLINK "http://en.wikipedia.org/wiki/Glycosidic_bond" glycosidic bonds and a terminal molecule of glucose [2]. Inulin can be used as raw material for the industry, for example, for production of fructose, spirit, and also as a technological component in manufacture of food substances (yoghurts, ice-cream). Polifructans possess some medical properties. Inulin carries out function of sorbent, connecting and deducing toxic substances from an organism; promotes restoration of normal microflora of intestines (prebiotic activity); normalizes an exchange of calcium and magnesium, lipids. PF, including inulin, use as the dietary additive at dysbolism, for treatment of dysbacterioses, diabetes, cardiovascular diseases.

The plants cultivated in vitro are the model on which it is possible to study features of PF biosynthesis. We investigate influence of medium compounds (macroelements, phytogormones) on PF maintenance in plants of chicory. We studied the plants of chicory C. intybus cv Pala Rossa and the modified chicory plants with interferon α2b gene [3]. The plants was cultivated in sterile conditions on solid Murasige and Scoog medium (MS) [4]; MS with twice reduced concentration of macroelements (1/2MS) and on the same media with addition of 0,5 mg/l indolilbutiric acids (MS-IBA and 1/2 MS-IBA). The PF maintenance determined by [5].

Maximal PF concentration was observed when the plants was grown on the 1/2MS-0,5IBA medium, minimal - on MS medium. So, double reduction of concentration of macroelements results in increasing of PF maintenances from 17 to 32 mg/g roots dry weight, and addition to MS medium of 0,5 mg/l IBA - up to 56 mg/g roots dry weight. Simultaneous reduction of macroelements concentration and addition of 0,5 mg/l IBA resulted in fivefold increasing in the PF maintenance - up to 92 mg/g roots dry weight. PF maintenance in the modified plants appeared much above, than in wild type plants - on the 1/2MS medium after 45 days up to 388 mg/g roots dry weight. Perhaps this features in PF biosynthesis can be explained by the using of Agrobacterium rhizogenes for the plants transformation [6].

On the preliminary data, the root extracts from plants of chicory (with PF) possesses biological activity, stimulating the growth of bacteria Bifidobacterium sp.

References:

1. *J.Edelman, T.G. Jefford.* The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in Helianthus tuberosus // New Phytol., 1968, Vol. 67, P. 516-531.
2. *Van den Ende, W., A.Michiels, J. De Roover, A. Van Laere.* Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of functional genes throughout chicory development. //Sci. World J. – 2002, vol. 11, № 2, P. 1273–1287.
3. *Н.А.Матвєєва, А.М.Шаховський, О.Ю.Кваско та ін.* Cichorium intybus L. як перспективний об'єкт генетичної інженерії//Фактори експериментальної еволюції. Збірник наукових праць. Т.7. – Київ, Логос. – 2009. – С. 236-241.
Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Physiol Plant. – 1962. – vol.15, № 3. – P. 473–496.
4. *А.И.Ермаков, В.В.Арасимович, Н.П. Ярош и др.* Методы биохимического исследования растений. - Л.:Агропромиздат, 1987. - С.143.
5. "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=%22Wang%20B%22%5BAuthor%5D"
6. *Chen L., Zhang Y.* Genetic transformation of *Echinacea purpurea* with *Agrobacterium rhizogenes* and bioactive ingredient analysis in transformed cultures // "Colloids and surfaces. B, Biointerfaces." Colloids Surf. B Biointerfaces. – 2006. – Vol. 53, № 1. – P.101-104.

НОВЫЕ ТАННИНЫ *PLANTAGO MAJOR L.* И *PLANTAGO LANCEOLATA L.*

Махмудов Р.Р., Мавлянов С.М., Абдулладжанова Н.Г.

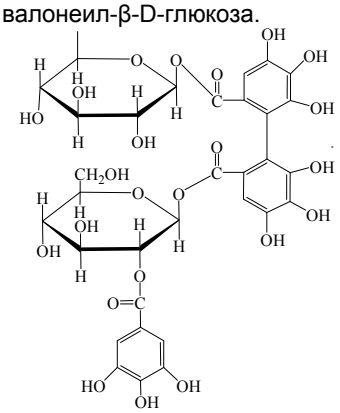
Институт биоорганической химии АН РУз, Ташкент Узбекистан
e-mail: ibchem@uzsci.net

Впервые из растений Plantago major L. и P. lanceolata L. выделены три новых таннина гидролизуемого ряда. На основании физико-химических свойств установлено их предположительные химические структуры.

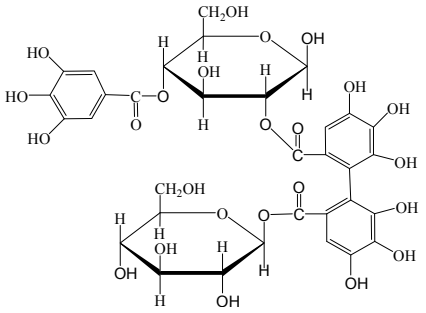
Вещество 1- выделено из P. major L., $C_{32}H_{32}O_{23}$, белый аморфный порошок. ИК-спектр (KBr, ν, см$^{-1}$): 3345-3350 (OH), 1710-1730 (сложноэфирная связь), 1510-1620 см$^{-1}$ (Ar), 1010-1020 (сахарный компонент). ПМР-спектр (200 МГц, δ, ацетон-d_6, м.д.): 4.24 (1H, д, J=7.7 Гц, ксилоза H-1), 3.03 (1H, м, J=9.3 Гц, ксилоза H-2), 3.11 (1H, м, J= 6.2 Гц, ксилоза H-3), 3.26 (1H, м, J=9.3 Гц, ксилоза H-4), 3.63 (1H, м, J=8.5 Гц, ксилоза H-5); 4.01 (1H, т, J=8 Гц, глюк. H-2), 4.20 (1H, д, J=12 Гц, глюк. H-6), 4.43 (1H, т, J=8 Гц, глюк H-4), 4.64 (1H, м, J=12 Гц, глюк. H -5), 4.60 (1H, т, J=8 Гц, глюк H -3), 6.01 (1H, д, J=8 Гц, глюк H-1), 7.00, 7.03, 7.08, 7.12, 7.16 (H, галлоил-гр), 6.62, 6.63, 6.70, 6.71 (H, гексагидроксидифеноильная гр). C^{13} ЯМР спектр (50 МГц, ацетон-d_6, м.д): ксилоза 97.6 (C-1), 70.07 (C-2), 68.6 (C-3), 73.0 (C-4), 64.6 (C-5), 14.6 (C-6), гексагидроксидифеноильная гр 115.5 (C-1), 125.8 (C-2), 107.08 (C-3), 145.8 (C-4), 136.6 (C-5), 144.4 (C-6), 167.6 (C-7), 115.6 (C-1'), 126.4 (C-2'), 108.2 (C-3'), 145.3 (C-4'), 136.5 (C-5'), 144.5 (C-6'), 168.00 (C-7'). глюкоза 93.6 (C-1), 71.05 (C-2), 73.00 (C-3), 70.6 (C-4), 73.00 (C-5), 63.0 (C-6), галлоильная гр: 120.4 (C-1), 110.1 (C-2), 145.8 (C-3), 139.1 (C-4), 145.8 (C-5), 110.1 (C-6), 165.3 (C-7). Таким образом, вещество 1 является диэфиром гексагидроксидифеноила-1-(O-2-O-галлоил-β-D-глюкопиранозида)-1-(O-β-D–ксилопиранозид).

Вещество 2- выделено из P. major L. $C_{33}H_{34}O_{24}$, белый аморфный порошок. ИК-спектр (KBr, ν, см$^{-1}$): 3345-3350 (OH), 1710-1730 (сложноэфирная связь), 1510-1620 (Ar), 1010-1020 (сахарный компонент). ПМР-спектр (200 МГц, ацетон-d_6, м.д.): 3.80, 3.87 (2H, dd, J=8 Гц, глюк -6), 5.14 (1H, d, J=6 Гц, глюк -1), 5.57 (1H, m, J=4 Гц, глюк H-3), 4.07 (1H, d, J=4 Гц, глюк H-2), 5.49 (1H, m, J=4 Гц, глюк H-4), 4.89 (1H, m, J=11 Гц, глюк H-5), 7.07, 7.10, 7.15, 7.21(H, галлоильная гр), 6.46, 6.64 (H, гексагидроксидифеноильная гр). C^{13} ЯМР спектр (50 МГц, ацетон-d_6, м.д.): гексагидроксидифеноильная гр: 115.5 (C-1), 125.8 (C-2), 107.08 (C-3), 145.8 (C-4), 136.6 (C-5), 144.4 (C-6), 167.6, (C-7) 115.6 (C-1'), 126.4 (C-2'), 108.2 (C-3'), 145.3 (C-4'), 136.5 (C-5'), 144.5 (C-6'), 168.00 (C-7'). глюкоза-1: 92.34 (C-1), 76.77 (C-2), 76.98 (C-3), 69.61 (C-4), 73.37 (C-5), 63.37 (C-6), глюкоза-2: 92.34 (C-1′), 75.38 (C-2′), 78.07 (C-3′), 66.89 (C-4′), 73.92 (C-5′), 63.57 (C-6′), галлоилная гр 120.4 (C-1), 110.1 (C-2), 145.8 (C-3), 139.1 (C-4), 145.8 (C-5), 110.1 (C-6), 165.3 (C-7). Таким образом, вещество 2 является - диэфиром гексагидроксидифеноила-1-(O-β-D-глюкопиранозидо)-2-(O-4-O-галлоил-β-D-глюкопиранозид).

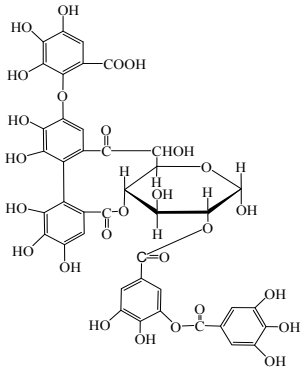
Вещество 3 – выделено из P. lanceolata L. $C_{41}H_{30}O_{27}$, аморфный порошок желтоватого цвета. ИК-спектр (KBr, ν, см$^{-1}$): 3345-3350 (OH), 1710-1730 (сложноэфирная связь), 1510-1620 (Ar), 1010-1020 (сахарный компонент).ПМР-спектр (200 МГц, ацетон-d_6, м.д.): 6.39 (1H, d, J=4 Гц, глюк H-1), 5.66 (1H, dd, J=4 Гц, 10, глюк H-2), 6.06 (1H, t, J=10 Гц, глюк H-3), 5.70 (1H, t, J=10 Гц, глюк H-4), 4.60 (1H, m, J=7 Гц, глюк H-5), 4.60 (2H, dd, J=7 Гц, глюк H-6), 7.03, 6.84, 6.54 (валонеил гр.), 6.84, 6.87, 7.10, 7.11, 7.16, 7.17 (галлоил гр.) C^{13} ЯМР спектр (50 МГц, ацетон- d_6, м.д.): глюкоза 92.34 (C-1), 76.77 (C-2), 76.98 (C-3), 69.61 (C-4), 73.37 (C-5), 63.37 (C-6); валонеильная гр. 114.42 (C-1), 126.56 (C-2), 106.61 (C-3), 144.99 (C-4), 136.13 (C-5), 144.58 (C-6), 169.57 (C-7), 116.63 (C-1'), 126.06 (C-2'), 102.64 (C-3'), 146.70 (C-4'), 135.36 (C-5'), 145.07 (C-6'), 168.33 (C-7'), 111.51 (C-1"), 135,50 (C-2"), 140.65 (C-3"), 139.90 (C-4"), 143.04 (C-5"), 110.29 (C-6"), 164.14 (C-7"), дигаллоильная гр 124.9 (C-1), 116.6 (C-2), 141.6 (C-3), 141.7 (C-4), 144.8 (C-5), 115.1 (C-6), 167.0 (C-7), 126.0, (C-1') 111.3 (C-2'), 145.8 (C-3'), 136.9 (C-4'), 145.8 (C-5'), 111.3 (C-6'), 164.1 (C-7'). На основании полученных данных структура вещества установлена как 2-O-бис-дигаллоил-4,6-валонеил-β-D-глюкоза.



Вещество-1



Вещество-2



Вещество-3

NEW TANNINS FROM *PLANTAGO MAJOR L.* AND *PLANTAGO LANCEOLATA L.* PLANTS

Mahmudov R.R., Mavlyanov S.M., Abdulladjanova N.G.

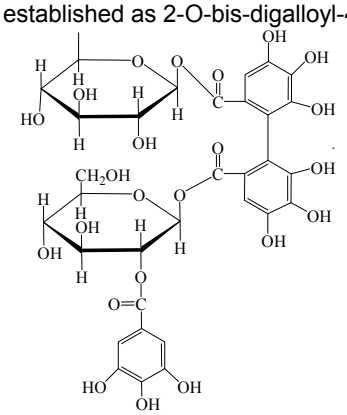
Institute of Bioorganic chemistry, Academy of Sciences Republic of Uzbekistan
e-mail: ibchem@uzsci.net

From the Plantago major L. and P. lanceolata L. plants three new tannins were isolated for the first time. On the base of chemical and physical properties their approximately chemical structures were established.

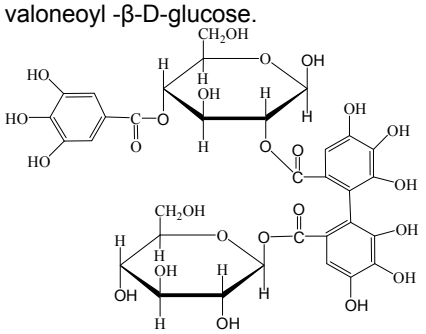
Compound 1- isolated from P. major L., molecular formula $C_{32}H_{32}O_{23}$, an of-white amorphous powder. IR-spectra (KBr, v_{max}, cm^{-1}): 3345-3350 (OH), 1710-1730 (ester bond), 1510-1620 cm^{-1} (Ar), 1010-1020 (sugar component). ^{1}H-NMR-spectra (200 MHz, acetone-d_6, ppm.) δ: 4.24 (1H, d, J=7.7 Hz, xylose H-1), 3.03 (1H, m, J=9.3 Hz, xylose H-2), 3.11 (1H, m, J= 6.2 Hz, xylose H-3), 3.26 (1H, m, J=9.3 Hz, xylose H-4), 3.63 (1H, m, J=8.5 Hz, xylose H-5); 4.01 (1H, t, J=8 Hz, glucose. H-2), 4.20 (1H, d, J=12 Hz, glucose. H-6), 4.43 (1H, t, J=8 Hz, glucose H-4), 4.64 (1H, m, J=12 Hz, glucose H-5), 4.60 (1H, t, J=8 Hz, glucose H-3), 6.01 (1H, d, J=8 Hz, glucose H-1), 7.00, 7.03, 7.08, 7.12, 7.16 (2H, s, galloyl group), 6.62, 6.63, 6.70, 6.71 (2H, s, gexahydroxydiphenoyl group). C^{13}-NMR (50 MHz, acetone-d_6, ppm.) δ: xylose 97.6 (C-1), 70.07 (C-2), 68.6 (C-3), 73.0 (C-4), 64.6 (C-5), 14.6 (C-6), gexahydroxydiphenoyl group 115.5 (C-1), 125.8 (C-2), 107.08 (C-3), 145.8 (C-4), 136.6 (C-5), 144.4 (C-6), 167.6 (C-7), 115.6 (C-1'), 126.4 (C-2'), 108.2 (C-3'), 145.3 (C-4'), 136.5 (C-5'), 144.5 (C-6'), 168.00 (C-7'). glucose 93.6 (C-1), 71.05 (C-2), 73.00 (C-3), 70.6 (C-4), 73.00 (C-5), 63.0 (C-6), galloyl groups: 120.4 (C-1), 110.1 (C-2), 145.8 (C-3), 139.1 (C-4), 145.8 (C-5), 110.1 (C-6), 165.3 (C-7). Thus, the compound-1 is di-ether gexahydroxydiphenoyl -1-(O-2-O-galloyl-β-D-glucopyranosido-1-(O-β-D–xylopyranosid).

Compound 2-isolated from P. major L. molecular formula $C_{33}H_{34}O_{24}$, an of-white amorphous powder . IR-spectra (KBr, v_{max}, cm^{-1}): 3345-3350 (OH), 1710-1730 (ester bond), 1510-1620 (Ar), 1010-1020 (sugar component). ^{1}H-NMR (200 MHz, acetone-d_6, ppm.) δ: 3.80, 3.87 (2H, dd, J=8 Hz, glucose-6), 5.14 (1H, d, J=6 Hz, glucose-1), 5.57 (1H, m, J=4 Hz, glucose H-3), 4.07 (1H, d, J=4 Hz, glucose H-2), 5.49 (1H, m, J=4 Hz, glucose H-4), 4.89 (1H, m, J=11 Hz, glucose H-5), 7.07, 7.10, 7.15, 7.21(2H, s, galloyl group.), 6.46, 6.64 (2H, s, gexahydroxydiphenoyl group). C^{13}-NMR (50 MHz, acetone-d_6, ppm.) δ: gexahydroxydiphenoyl (HHDP) group: 115.5 (C-1), 125.8 (C-2), 107.08 (C-3), 145.8 (C-4), 136.6 (C-5), 144.4 (C-6), 167.6, (C-7) 115.6 (C-1'), 126.4 (C-2'), 108.2 (C-3'), 145.3 (C-4'), 136.5 (C-5'), 144.5 (C-6'), 168.00 (C-7'). glucose-1: 92.34 (C-1), 76.77 (C-2), 76.98 (C-3), 69.61 (C-4), 73.37 (C-5), 63.37 (C-6), glucose-2: 92.34 (C-1′), 75.38 (C-2′), 78.07 (C-3′), 66.89 (C-4′), 73.92 (C-5′), 63.57 (C-6′), galloyl groups 120.4 (C-1), 110.1 (C-2), 145.8 (C-3), 139.1 (C-4), 145.8 (C-5), 110.1 (C-6), 165.3 (C-7). Thus, the substance 2 is - di-ether gexahydroxydiphenoyl-1-(O-β-D- glucopyranosido)-2-(O-4-O-galloyl-β-D- glucopyranosid).

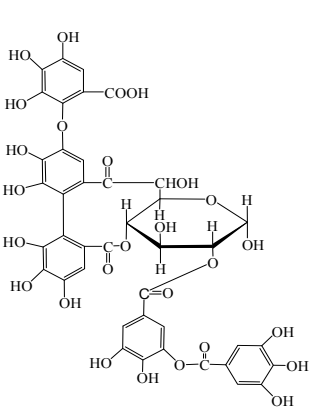
Compound 3 – isolated of P. lanceolata L. molecular formula $C_{41}H_{30}O_{27}$, nankeen amorphous powder. IR-spectra (KBr, v_{max}, cm^{-1}): 3345-3350 (OH), 1710-1730 (ester bond), 1510-1620 (Ar), 1010-1020 (sugar component). ^{1}H-NMR (200 MHz, acetone-d_6, ppm.) δ: 6.39 (1H, d, J=4 Hz, glucose H-1), 5.66 (1H, dd, J=4 Hz, 10, glucose H-2), 6.06 (1H, t, J=10 Hz, glucose H-3), 5.70 (1H, t, J=10 Hz, glucose H-4), 4.60 (1H, m, J=7 Hz, glucose H-5), 4.60 (2H, dd, J=7 Hz, glucose H-6), 7.03, 6.84, 6.54 (3H, s, valoneoyl group.), 6.84, 6.87, 7.10, 7.11, 7.16, 7.17 (2H, s, galloyl group.) C^{13}-NMR cpectra (50 MHz, acetone-d_6, ppm) δ: glucose 92.34 (C-1), 76.77 (C-2), 76.98 (C-3), 69.61 (C-4), 73.37 (C-5), 63.37 (C-6); valoneoyl group., glucose 114.42 (C-1), 126.56 (C-2), 106.61 (C-3), 144.99 (C-4), 136.13 (C-5), 144.58 (C-6), 169.57 (C-7), 116.63 (C-1'), 126.06 (C-2'), 102.64 (C-3'), 146.70 (C-4'), 135.36 (C-5'), 145.07 (C-6'), 168.33 (C-7'), 111.51 (C-1"), 135,50 (C-2"), 140.65 (C-3"), 139.90 (C-4"), 143.04 (C-5"), 110.29 (C-6"), 164.14 (C-7"), di-galloyl groups. 124.9 (C-1), 116.6 (C-2), 141.6 (C-3), 141.7 (C-4), 144.8 (C-5), 115.1 (C-6), 167.0 (C-7), 126.0, (C-1') 111.3 (C-2'), 145.8 (C-3'), 136.9 (C-4'), 145.8 (C-5'), 111.3 (C-6'), 164.1 (C-7'). On the bases of received data the structure of the substance is established as 2-O-bis-digalloyl-4,6- valoneoyl -β-D-glucose.



Compound-1



Compound -2



Compound -3

НОВЫЕ ИСТОЧНИКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Мащенко Н.Е., Кинтя П.К.

Институт Генетики и Физиологии Растений АН РМ, , Кишинев,Молдова
e-mail: chinteap@yahoo.com

Стероидные гликозиды (СГ) – вторичные метаболиты высших растений, представляют собой распространенную группу природных биологически активных соединений, изучению которой посвящены многочисленные исследования в области химико – биологических знаний. Спектр их физиологического действия и уровень биологической активности зависят как от химической структуры, так от используемой концентрации и способа применения указанных веществ. Антиоксидантные свойства, гипохолестеринемическое, рострегулирующее, фунгицидное действие делают этот класс БАВов привлекательным для детального исследования, поскольку, наряду с низким уровнем токсичности, доступность источников получения позволяет рекомендовать их для практического использования в растениеводстве и медицине.

Для выявления дополнительных источников БАВов гликозидной природы, обладающих высоким уровнем активности, мы исследовали ряд представителей дикорастущей флоры Молдовы сем. *Scrophulariaceae*, фармацевтические свойства которых используются в традиционной и народной медицине. К таковым относятся некоторые виды *Verbascum, Linaria, Digitalis*.

Из суммарных экстрактов каждого растения хроматографическими методами были получены индивидуальные соединения, химическую структуру которых определили с помощью спектральных методов анализа. Среди выделенных веществ идентифицировали стероидные, фенольные, иридоидные гликозиды, причем, некоторые из них были получены впервые. Для суммарных гликозидных фракций, а также индивидуальных соединений был определен спектр биологической активности. Так, гликозиды из *Linaria vulgaris Mill*. при предпосевном замачивании семян перца сладкого в их растворах повышают устойчивость указанной культуры к холодовому стрессу на 40% независимо от сорта. Гликозиды из *Verbascum phlomoides* L. увеличивают семенную продуктивность лекарственных растений до 70%. Эти же соединения индуцируют устойчивость зерновых культур к абиотическим и биотическим стрессам. Все это, наряду с доступностью источников сырья, позволяет рекомендовать гликозиды из растений сем. Норичниковых для детальных исследований с целью широкого использования в сельскохозяйственной практике.

NEW SOURCES OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

Mashchenko N.E., Kintya P.K.

The Institute of Genetics and Plant Physiology, Academy of Sciences of Moldova,
Kishinau, The Republic of Moldova
e-mail: chinteap@yahoo.com

Steroidal glycosides (SG) - secondary metabolites of higher plants, is a common group of biologically active compounds and its study is the subject of numerous research works in the field of chemical and biological knowledge. The range of their physiological action and the level of biological activity depend on their chemical structure, the concentration used and the method of application of these substances. Their antioxidant properties, hypocholesterolemic, growth regulator, fungicide action make this class of biologically active compounds attractive for detailed study because, along with low toxicity, the availability of sources of them can be recommended for practical use in crop production and medicine.

To identify additional sources of biologically active compounds of glycoside nature, which posses a high level of activity, we examined a number of representatives from fam. *Scrophulariaceae* of wild flora Moldova, pharmaceutical properties of which are used in traditional and folk medicine. These include some types of *Verbascum*, *Linaria*, *Digitalis*.

From total extracts of each plant by chromatographic methods individual compounds were obtained, the chemical structure of which defined by means of spectral analysis methods. Steroidal, phenol, iridoid glycosides were identified among the isolated compounds, some of which were obtained for the first time. As well as for a summary of glycoside fractions and individual compounds was determined the spectrum of biological activity. Thus, the glycosides from *Linaria vulgaris Mill*. for pre-soaking of seeds of sweet pepper in their solutions, increase the stability of this culture to cold stress at 40% regardless of the grade. Glycosides from *Verbascum phlomoides L*. increase the seed production of medicinal plants up to 70%. These compounds induce the resistance of crops to abiotic and biotic stresses. All this, along with the availability of raw materials, can be recommended for detailed studies to extensive use in agricultural practices.

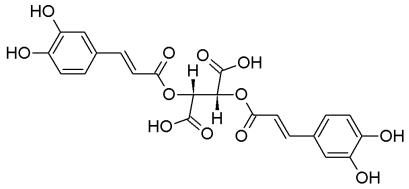
ВМІСТ ЦИКОРІЄВОЇ І КАФТАРОВОЇ КИСЛОТ У ІНФІКОВАНИХ ВІРУСАМИ РОСЛИНАХ ЕХІНАЦЕЇ ПУРПУРОВОЇ

[1]Міщенко Л.Т., [1]Дуніч А.А., [2]Середа О.В., [3]Ховака В.В., [1]Весельський С.П.

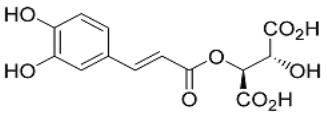
[1]Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail: lmishchenko@ukr.net
[2] Дослідна станція лікарських рослин УААН, с. Березоточа Полтавської обл., Україна
[3]ДУ «Інститут ендокринології і обміну речовин ім. В.П. Комісаренка» АМН України

Культура *Echinacea purpurea* (L.) Moench., безумовно, є однією з найбільш широко вживаних видів лікарських рослин, оскільки характеризується різнобічним терапевтичним ефектом. Останній досягається завдяки високому вмісту у рослинній сировині біологічно активних речовин (БАР).

Одним із основних показників якості та стандартизації лікарської сировини з рослин ехінацеї пурпурової є вміст у ній похідних гідроксикоричних кислот (ГОКК). Відомо, що рослини роду *Echinacea* містять декілька похідних ГОКК (кон'югатів кофейної кислоти): цикорієву кислоту (рис. а), кафтарову (рис. б), хлорогенову, нехлорогенову, кофейну та інші (1). Кожен із трьох видів роду *Echinacea*, що використовуються у медицині, має різний процентний вміст вказаних сполук. У рослинах *Echinacea purpurea,* серед перелічених речовин, домінуючим компонентом є цикорієва кислота, вміст якої може складати до 70% від загальної кількості похідних ГОКК. Не менш важливою є кафтарова кислота, якій притаманна противірусна (антигіалуронідазна) активність (2). Тому для оцінки якості лікарської сировини з рослин *Echinacea purpurea,* як у країнах Європи і РФ, так і в Україні, застосовують методики визначення ГОКК у перерахунку саме на вказані кислоти.



а



б

У світовій та вітчизняній літературі є дані про вплив вірусів на якість рослинної сировини, а саме про зниження БАР у інфікованих рослинах. Так, наприклад, у попередні роки, використовуючи методику визначення вмісту суми похідних гідроксикоричних кислот в перерахунку на цикорієву кислоту, нами було встановлено, що у вірусінфікованій ехінацеї пурпуровій міститься 2,3% ГОКК, тоді як у контрольних рослинах цей показник був вищим – 2,7% (3). Зважаючи на це, інтерес представляло перевірити чи повториться така тенденція в наступних роках.

Для досліджень у 2009 р. були відібрані рослини *Echinacea purpurea* з симптомами вірусного захворювання: мозаїки листової пластинки та затримки росту. Визначення вмісту кафтарової та цикорієвої кислот та їх суми у перерахунку на суху речовину здійснювали методом рідинної хроматографії (ВЕРХ),(4).

Нами встановлено, що у вірусінфікованих рослинах вміст кафтарової та цикорієвої кислоти, а також їх сума суттєво знижені в 3, 4,3 і 3,9 рази відповідно. Результати досліджень представлені в таблиці.

Вміст похідних кофейної кислоти у надземній частині вірус інфікованих рослин *Echinacea purpurea,* %

Варіант	Кафтарова кислота	Цикорієва кислота	Сума кислот	Вміст на абсолютносуху вагу
вірусінфіковані	0,340	0,513	0,853	0,948
здорові	1,057	2,242	3,299	3,881

За стандартами України сировина з ехінацеї пурпурової вважається придатною для використання у фармакології якщо вміст суми кафтарової та цикорієвої кислот у ній у перерахунку на суху речовину складає не менше 0,1 % (2). У нашому випадку цей показник становив більше зазначеного мінімуму – 0,9%. Проте отримані результати чітко демонструють негативний вплив вірусної інфекції на вміст головних біологічно активних речовин у рослинах: кількість кафтарової кислоти зменшилася на 32,2 %, цикорієвої – на 22,9 %, сума кислот – на 25,9 %.

Таким чином, наші дослідження показали, що захворювання вірусної етіології представляє реальну загрозу для якості лікарських препаратів з ехінацеї пурпурової, так як значно зменшується вміст у рослинах основних біологічно активних речовин, які обумовлюють їх лікувальну дію.

Література:

1. *Lee J.* Caffeic acid derivatives in dried Lamiaceae and Echinacea purpurea products / Jungmin Lee // J. of functional foods.– 2010. – № 2. – P. 158 –162.
2. *Середа А. В.* Биологически активные вещества и стандартизация лекарственных растений рода *Echinacea* / А. В. Середа, Г. Ф. Моисеева // Фармаком. – 1998. – №3. – С. 13–23.
3. *Мищенко Л. Т.* Своевременная диагностика вирусных инфекций – важный элемент технологии выращивания лекарственных растений / Л. Т. Мищенко, А. А. Коренева, Л. А. Глущенко // Защита растений: сб. науч. трудов/ РУП "Институт защиты растений». – Несвиж: Несвиж. укрупн. тип. – 2008, Вып. 32. – С. 208–215.
4. Ехінацея пурпурова трава // Державна Фармакопея України. – 1-е вид. – Доповнення 3. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2009. – С. 184-185.

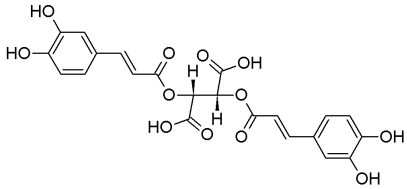
CONTENT OF CICHORIC AND CAFTARIC ACID IN ECHINACEA PURPUREA PLANTS INFECTED WITH VIRUSES

[1]Mishchenko L.T., [1]Dunich A.A., [2]Sereda O.V., [3]Hovaka V.V., [1]Veselsky S.P.

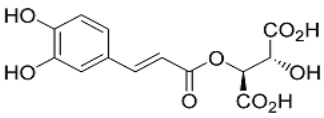
[1]Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine
e-mail: lmishchenko@ukr.net
[2] Medicinal plants research station of Ukrainian Academy of Agricultural Sciences, Berezotocha, Ukraine
[3]V. P. Komisarenko'Institute of endocrinology and metabolism, Academy of medical sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Certainly *Echinacea purpurea* (L.) Moench. is the one of the most widly used species of medicinal plants as characterized by versatile therapeutic effect. This effect is reached thanks to hight content of biologically active substances in raw material.

Hydroxycinnamic acid is indicator of quality of echinacea plants and used in standardization of medicinal material and drugs. It is known that echinacea plants have some derivatives of hydroxycinnamic acid: cichoric (fig. a), caftaric acid (fig. b), coffee acid etc (1). Each of three species of the genus *Echinacea* that are used in medicine, contains different percentage content of these substances. Cichoric acid is dominant component in *Echinacea purpurea* plants, its quantity could be 70 % from total content of hydroxycinnamic acid derivatives. Caftaric acid is also very important because its inherent antiviral (antigialuronic) activity (2). That's why thechniqes for hydroxycinnamic acid' definition in recalculation on just these acids both in Europian contries, Russian Federation and in Ukraine are using for estimation of medicinal raw materials quality.



a



b

There are data about effect of viruses on medicinal material' quality namely about decrease of biologically active substances in infected plants both in the world and domestic literature. For example, in previous years our research showed that echinacea plants infected with CMV have 2,3% hydroxycinnamic acid, healthy plants - 2,7% (3). That's why we were interested whether to check up to repeat such tendency in next years.

In 2009 *Echinacea purpurea* plants with viral disease symptoms such as mosaic on leaves and stunting were taken for studing. Definition of cichoric and caftaric acid content and there sum in recalculation on dry substance carried out with liquid chromatography (4).

We are established that in virus infected plants content of cichoric and caftaric acid and their sum were significantly decreased in 3, 4,3 i 3,9 accordingly. Results are presented in table.

Content derivatives coffee acid in underground part of virusinfected *Echinacea purpurea* plants, %

Variant	Caftaric acid	Cichoric acid	Sum of acids	Content on absollutly dry weight
infected	0,340	0,513	0,853	0,948
health	1,057	2,242	3,299	3,881

It is known that echinacea plant material that has less 0,1 % content of cichoric and caftaric acid isn't able to using in pharmaceutical industry in Ukraine (2). In our case this parameter was higher than such minimum – 0,9%. But our results demonstrate negative effect of viral infection on the content of main biologocally active substances in plants. Content of caftaric acid decrease on 32,2 %, cichoric acid - on 22,9 %, sum of acid – 25,9%.

Thus, our research demonstrate that viral disease of echinacea it is real threat to quality of drugs on *Echinacea purpurea'* basis as content main biologicaly active substances that caused trethment action significantly decrease.

References:

1. *Lee J.* Caffeic acid derivatives in dried Lamiaceae and Echinacea purpurea products / Jungmin Lee // J. of functional foods.– 2010. – № 2. – P. 158 –162.
2. *Середа А. В.* Биологически активные вещества и стандартизация лекарственных растений рода *Echinacea* / А. В. Середа, Г. Ф. Моисеева // Фармаком. – 1998. – №3. – С. 13–23.
3. *Мищенко Л. Т.* Своевременная диагностика вирусных инфекций – важный элемент технологии выращивания лекарственных растений / Л. Т. Мищенко, А. А. Коренева, Л. А. Глущенко // Защита растений: сб. науч. трудов/ РУП "Институт защиты растений». – Несвиж: Несвиж. укрупн. тип. – 2008, Вып. 32. – С. 208–215.
4. Ехінацея пурпурова трава // Державна Фармакопея України. – 1-е вид. – Доповнення 3. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2009. – С. 184-185.

ЦИСТОЗІРА ЯК ДЖЕРЕЛО ФІЗІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Мусатенко Л.І., Войтенко Л.В., Васюк В.А.

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, Київ, Україна
e-mail: Phytohormonology@ukr.net

Заміна на природні аналоги хімічних добрив, синтетичних регуляторів росту рослин та отрутохімікатів у народному господарстві є важливою проблемою сучасних досліджень. Велике різноманіття водоростей, перш за все макрофітів, викликає інтерес щодо їх вивчення, як перспективних продуцентів фізіологічно активних речовин при створенні екологічно чистих регуляторів росту рослин. У багатьох прибережних країнах Європи, Африки, Америки та ін. країн промислове виробництво таких препаратів як ”Maxicrop”, ”Sea Magic”, ”Nitrozyme”, ”Redicrop”, ”SM_3”, ”Kelpak 66”, ”Seasol” базується на використанні цілого ряду представників бурих макроводоростей – *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis, *Tasmanian giant* Bull. Kelp., *Durvillea potatorum* (Labill.) Aresch, *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenf. тощо. Ці комплексні препарати містять широкий спектр біологічно активних речовин, в тому числі фітогормони різної природи, альгінати, ламінарин, поліфеноли, мікро- та макроелементи тощо. Аналогічних розробок в Україні не проводилось, хоча і використовуються препарати, отримані з одноклітинних водоростей, зібраних як в природних популяціях так і культурального походження.. Відомо, що найпродуктивнішим домінуючим видом фітоценозів Чорного моря є бура макроводорість *Cystoseira barbata* (Good et Wood), найбільше накопичення біомаси якої виявлено в осінній та весняний періоди вегетації. З метою найефективнішого використання природних популяцій цистозіри та її викидів для створення препаратів з високою фізіологічною активністю необхідно встановити оптимальні періоди її розвитку щодо максимального накопичення фітогормонів.

Нами досліджувалась сезонна динаміка вмісту фітогормонів у чорноморської макроводорості *C. barbata*, відібраної у бухтах Севастополя. Показано, що протягом всього року в екстрактах спостерігалась незначна активність гібереліноподібних речовин. Восени та взимку рівень ІОК знижувався. Найвищі рівні цитокінінів були визначені у водоростей взимку, а весною та восени (в період її інтенсивного росту) їх вміст знижувався. Фізіологічна активність наведених вище препаратів обумовлена наявністю головним чином цитокінінів. Враховуючи це, а також отриманні результати дослідження фітогормонів у цистозіри з максимумом цитокінінів в її таломі взимку дає підстави рекомендувати збір водоростей саме у цей період.

CYSTOSEIRA AS A SOURCE OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Musatenko L.I., Voytenko L.V., Vasjuk V.A.

M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: Phytohormonology@ukr.net

The replacement of synthetic growth regulators and other chemicals used in the national economy for the natural analogues of chemical fertilizers is a very important subject of modern researches. A great diversity of algae, primarily macrophytes, arouses interest for their studies as promising producers of physiologically active substances in the process of preparing the ecologically pure plant growth substances. For the commercial production of such preparations as ”Maxicrop”, ”Sea Magic”, ”Nitrozyme”, ”Redicrop”, ”SM_3”, ”Kelpak 66”, ”Seasol” many coastal countries of Europe, Africa and America and others use a number of brown algae – *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis, *Tasmanian giant* Bull. Kelp., *Durvillea potatorum* (Labill.) Aresch, *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenf. These complex preparations contain a wide spectrum of biologically active substances among which there are various phytohormones alginates, laminarin, polyphenols, micro- and macroelements etc. Ukraine has not carried out any similar activities though the preparations made of unicellular algae collected both from natural populations and cultivated ones are here used. *Cystoseira barbata* (Good et Wood), is known to be the most productive dominant species of the Black Sea phytocenosis and its greatest accumulation of biomass was observed in the autumn and spring period of vegetation. The determination of an optimal period of its development concerning the maximum phytohormone accumulation requires an efficient use of natural populations of *Cystoseira barbata* and its discharges to the shore in order to make preparations with a high physiological activity.

The seasonal dynamics of phytohormone content in the Black Sea *C. barbata* collected in Sevastopol bays was studied. Extracts were shown to have an insignificant activity of gibberrelin-like substances during the whole year. In autumn and winter the IAA level decreased. The alga highest levels of cytokinins were observed in winter while in spring and autumn (during its intensive growth) their content reduced. The above preparations` physiological activity is primarily conditioned by the presence of cytokinins. Taking into account this fact as well as the data obtained in phytohormone studies of *C. barbata* with a maximum cytokinin content in its tallus in winter, we conclude that this period is the most appropriate for this alga harvest.

ВИВЧЕННЯ ФОТОДИНАМІЧНОЇ АКТИВНОСТІ РЕЧОВИН, ЯКІ МІСТЯТЬСЯ В РОСЛИНАХ РОДУ *HERACLEUM*

Павлючок-Гогерчак О.В., Суховія М.І.

Ужгородський національний університет, фізичний факультет, Ужгород, Україна
e-mail: Pavlyuchok@rambler.ru

Дослідження фотобіологічних явищ, в основі яких лежить регуляція світлом процесів життєдіяльності організмів, є одним із актуальних напрямків сучасної біології і медицини. На сьогодні існує багато барвників, які з'єднуються з різними клітинними структурами і, поглинаючи світло, можуть сенсибілізувати їхнє фотопошкодження [1]. Актуальним є вивчення фотосенсибілізуючої активності природних барвників рослин, розповсюджених на території України. Серед них особливе місце посідають рослини роду Heracleum (Борщівник або Гераклова трава), які ростуть у зоні активної діяльності людей і несуть потенційну загрозу для їх здоров'я. У Карпатському регіоні, зокрема, розповсюджені такі види роду Heracleum – борщівник Сосновського (Heracleum sosnowskyi Manden.) та борщівник європейський (*Heracleum sphondylium* L.). Контакт із цими рослинами спричинює опіки в людини, які посилюються під дією сонячних променів [2]. Це дає підстави вважати, що ураження відбувається внаслідок фотодинамічного ефекту. Однак молекулярні механізми фотовпливу в даному конкретному випадку залишаються нез'ясованими. Тому завданням нашої роботи було вивчення фотодинамічної активності природних барвників, виділених із рослин роду Heracleum.

Спектральними методами досліджувалась природа і активність речовин, виділених із Heracleum sosnowskyi Manden. Досліди проводились при різних світлових умовах: розсіяне денне світло, ультрафіолетове випромінювання (некогерентне і лазерне). Вивчались спектри поглинання і люмінесценції біопрепаратів в ультрафіолетовій та видимій областях спектру. Аналізувались особливості комплексоутворення цих речовин з важливими біомолекулами – нуклеїновими кислотами та їх компонентами. Для порівняння досліджувались комерційні препарати різних барвників кумаринового ряду.

Експерименти показали, що в області від 280 до 680 нм у спектрах поглинання та люмінесценції спиртових витяжок H. sosnowskyi Manden. наявні кілька широких інтенсивних смуг, які перекриваються. Порівняння із спектрами ізольованих препаратів барвників дало змогу ідентифікувати виділені із борщівника речовини. Вивчення якісного складу цих рослин виявило наявність в них низки природних барвників, в тому числі кумаринових та порфіринових похідних. Відомо, що ці речовини володіють фотосенсибілізуючою активністю. Крім того, аналіз спектральних характеристик сумішей цих препаратів з біомолекулярними (нуклеїновими кислотами та їх компонентами) засвідчив утворення міжмолекулярних комплексів. Вивчення кінетики взаємодії даних сполук показало, що в нуклеїнових кислотах у присутності речовин, виділених із Heracleum, виникають зміни просторової структури. Таким чином, отримані нами експериментальні результати у цьому конкретному випадку дозволили з'ясувати молекулярні механізми фотовпливу.

Література:

1. *Рубин А.Б., Фрайкин Г.Я.* Первичные молекулярные механизмы фотобиологических процессов и деструктивное действие оптического излучения // Успехи современной биологии.-1987.-Т.103,№ 3.- С. 323 - 339.
2. *Nielsen, C., Ravn, H. P., Nentwig, W. and Wade, M. (eds.).* Guidelines for the management and control of an invasive weed in Europe. 2005 - Forest and Landscape Denmark, Hoersholm, 44 pp.

STUDY OF PHOTODYNAMIC ACTIVITY OF SUBSTANCES CONTAINED IN PLANTS OF HERACLEUM SPECIES

Pavlyuchok-Gogertchak O.V., Sukhovia M.I.

Uzhgorod National University, Department of Physics, Uzhgorod, Ukraine
e-mail: Pavlyuchok@rambler.ru

Research of photobiological phenomena, which are based on regulation of biological processes in living organisms with help of light, is one of the important areas of modern biology and medicine. Today are known many dyes, which can merge with different cellular structures and by absorbing light can sensitize they photodamage [1]. Important is study of photosensitive activity of natural plant dyes common on the territory of Ukraine. Among them special place belong to the plants of Heracleum species, which are growing in the zone of human activities and are a potential threat to their health. In the Carpathian region are common next Heracleum species - Heracleum sosnowskyi Manden and Heracleum sphondylium L. Contact with these plants causes burns to human body that increase with the influence of sunlight [2]. This suggests that damage is the result of photodynamic effect. However, the molecular processes of photoinfluence in this particular case remain unclear. Therefore, the task of our work was to study the photodynamic activities of natural dyes, isolated from the plans of Heracleum species.

With help of spectroscopic methods was studied the nature and activity of substances isolated from Heracleum sosnowskyi Manden. Experiments were conducted under different light conditions: dispersed daylight, ultraviolet light (noncoherent and laser). Absorption and luminescence spectra of biological products were studied in the ultraviolet and visible spectral regions. Features of complexation of these substances with important biomolecules were analyzed - nucleic acids and their components. For comparison, commercial specimens where studied of various coumarin row dyes.

Experiments have shown that in the region from 280 to 680 nm in absorption and luminescence spectra of alcoholic extracts of H. sosnowskyi Manden. are located more than one broad intense bands that overlap. Comparison with the spectra of isolated products allowed us to make identification of extracted from Heracleum substances. Study of the qualitative composition of these plants revealed the presence in them a number of natural dyes, including coumarin and porphyrin derivatives. It is known that these substances possess photosensitive activity. In addition, analysis of spectral characteristics of mixtures of these specimens with biomolecules (nucleic acids and their components) showed the formation of intermolecular complexes. Study of kinetics interaction of these compounds showed that in the nucleic acids in the presence of substances extracted from Heracleum changes in spatial structure occur. This way, obtained by us experimental results allowed to clarify molecular mechanisms of photoinfluence.

References:

1. *Рубин А.Б., Фрайкин Г.Я.* Первичные молекулярные механизмыфотобиологических процессов и деструктивное действие оптическогоизлучения // Успехи современной биологии.-1987.-Т.103,№ 3.- С. 323 - 339.
2. *Nielsen, C., Ravn, H. P., Nentwig, W. and Wade, M. (eds.).* Guidelines for the management and control of an invasive weed in Europe. 2005 - Forest and Landscape Denmark, Hoersholm, 44 pp.

ТРИТЕРПЕНОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ ПРОДУЦИРУЕМЫЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРОЙ *FATSHEDERA*

Панов Д.А., Брановицкая Т.Ю., Чмелева С.И.

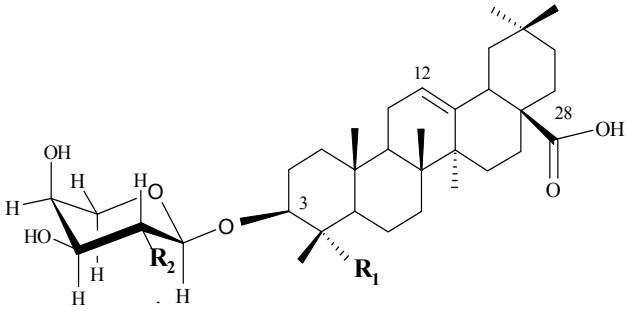
Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина,
e-mail: mendes@inbox.ru

Поиск новых биологически активных природных или синтетических соединений продолжает оставаться актуальной задачей современной науки. Однако поиск новых способов получения лекарственных веществ уже имеющих подтвержденную биологическую активность так же является актуальной задачей. Тем более что подавляюще большинство лекарственных средств в настоящее время получают из природных растительных ресурсов, зачастую из редких или исчезающих видов, что приводит к появлению дефицита биоматериала. В настоящее время хорошие перспективы показали методы биотехнологического получения фитомассы, позволяющие из небольшого части интактного материала получить достаточное количество биоматериала, содержащего различные вторичные метаболиты, проявляющие биологическую активность. Как раз к такому типу перспективного растительного сырья можно отнести гибрид *Fatsia japonica* "Moseri" и *Hedera helix* var. hibernica (растения семейства *Araliaceae*) – *Fatshedera (X)*. Данное растение содержит тритерпеновые гликозиды, для которых был установлен широкий спектр биологической активности, в том числе антигрибковая, ихтиотоксическая, антивирусная, антираковая, антимутагенная и ряд других. Целью данной работы было установить принципиальную возможность получения каллусных культур *Fatshedera*, содержащих биологически активные тритерпеновые гликозиды.

Для получения каллусных культур были использованы листовые экспланты. Культивирование изолированных листовых эксплантов фатсхедеры проводили на модифицированных питательных средах Мурасиге и Скуга (МС). Направленность процессов развития в условиях *in vitro* зависела от типа и концентрации экзогенных регуляторов роста. Максимальная частота каллусообразования и продуцирования вторичных метаболитов была достигнута на модифицированных питательных средах Мурасиге и Скуга, дополненных фитогормонами: α-нафтилуксусной кислотой (НУК) ($МС_1$) и 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) ($МС_2$).

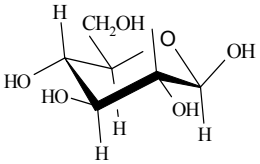
ТСХ анализ на содержание тритерпеновых гликозидов показал, что каллусные культуры содержат те же основные гликозиды, что и интактные листья *Fatshedera*, однако их качественный и количественный состав отличался в зависимости от состава питательной среды. Наилучший результат был достигнут на питательной среде $МС_1$, куллусная ткань содержала максимальные концентрации биологически активных малополярных фракций гликозидов, причем продуцируются преимущественно монодесмозидные гликозиды, содержащие углеводный компонент только по атому агликона С-3: 3-О-α-*L*-арабинопиранозиды олеаноловой кислоты (**1**) и хедерагенина (**2**) и 3-О-β-*D*-глюкопиранозил-(1→2)-О-α-*L*-арабинопиранозиды олеаноловой кислоты (**3**) и хедерагенина (**4**) (Рис.). А культуры тканей выращенные на питательной среде $МС_2$ содержали только фракции тритерпеновых гликозидов **1** и **2**.

Таким образом, куллусные культуры гибрида *Fatshedera* являются перспективным источником биологически активных тритерпеновых гликозидов идентичных гликозидам как интактного растения фатсхедера, так и *Fatsia japonica*.



1, 2 $R_2 = OH$

3, 4 $R_2 =$



1, 3 $R_1 = CH_3$

2, 4 $R_1 = CH_2OH$

Рис. Строение тритерпеновых гликозидов **1–4**

TRITERPENE GLYCOSIDES PRODUCTED BY CALLUS CULTURE OF *FATSHEDERA*

Panov D.A., Branovickaya T.Yu., Chmeleva S.I.

V.I. Vernadskiy Tavricheskiy National University, Simferopol, Ukraine
e-mail: mendes@inbox.ru

The search of new bioactive natural or synthetic compounds continues to remain the actual task of modern science. However search of new methods of receipt of drugs preparation already having the confirmed biological activity similarly is an actual task. Especially as repressing majority drugs products now make from the natural crude drug received, as a rule, from natural plant resources that results in appearance of deficit of biomaterial. Presently good prospects showed the methods of biotechnological receipt phytomass, allowing from small parts of intact material to get the sufficient amount of biomaterial, containing different secondary metabolites showing biological activity. Just to such type of perspective plant raw materials it is possible to take the hybrid of *Fatsia japonica* "Moseri" and *Hedera helix* var. Hibernica (plants of family of *Araliaceae*) – *Fatshedera* (X). This plant contains triterpene glycosides for that the wide spectrum of biological activity was set, including antifungal, ichthyotoxic, antiviral, anticancer, antimutagene and rows other. The purpose of the given work was to set fundamental possibility of receipt of *Fatshedera* callus cultures containing bioactive triterpene glycosides.

For the receipt of callus cultures were used segments of leaves explants. Cultivation the isolated leaves explants *Fatshedera* conducted on the modified Murashige and Skoog (MS) nutrient medium. The orientation of developments in conditions *in vitro* depend from type and concentration exogenous growth regulators. The maximum frequency callus-constitution and producing of secondary metabolites was attained on the modified Murashige and Skoog nutrient medium added by phytohormones: α-naphthylacetic acid (MS_1) and 2,4-dechlorphenoxyacetic acid (2,4-D) (MS_2).

The TLC analysis on the maintenance triterpene glycosides showed that callus cultures contain the same major glycosides, as intact leaves, however their concentration differed depending on nutrient medium structure. Callus, grown up on MS_1 medium, contained the maximum concentration biologically active low-polarity glycosides fractions, thus producing glycosides containing a carbohydrate component only on the atom of aglycone C-3: oleanolic acid (**1**) and hederagenin (**2**) 3-O-α-*L*-arabinopyranosides and oleanolic acid (**3**) and hederagenin (**4**) 3-O-β-*D*-glucopyranosyl-(1→2)-O-α-*L*-arabinopyranosides (Fig.). And the cultures of grown up on nutrient medium MS_2 contained only triterpene glycosides fractions **1** and **2**.

Thus, callus cultures of *Fatshedera* hybrid are the perspective source of bioactive triterpene glycosides, glycosides typical for both intact plants of *Fatshedera* and *Fatsia japonica*.

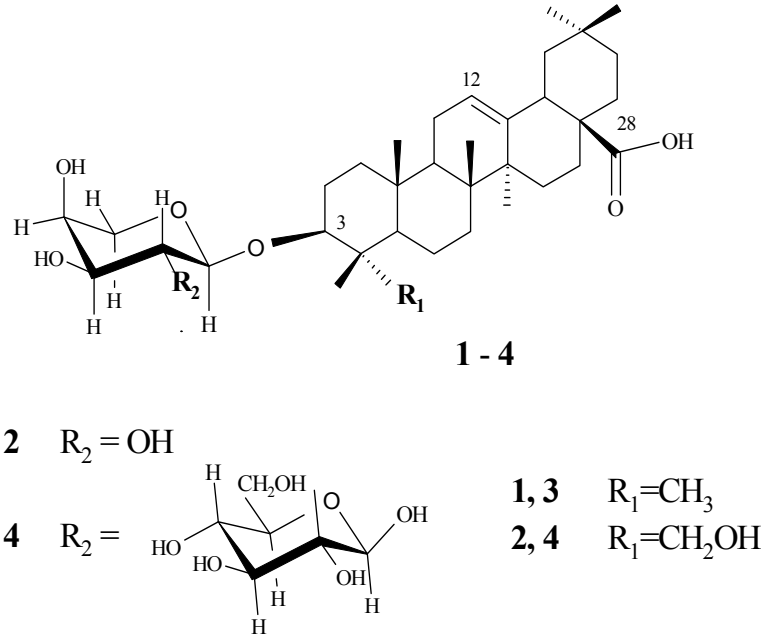


Fig. Structure of triterpene glycosides **1**–**4**.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТИОНИНА И ФЕНИЛАЛАНИНА В БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВКАХ

[1]Пахомова О.А., [2]Мокшина Н.Я., [1]Коренман Я.И., [1]Нифталиев С.И.

[1] Воронежская государственная технологическая академия, Воронеж, Россия
e-mail: pakhomchik@mail.ru
[2] Военный авиационный инженерный университет, Воронеж, Россия
e-mail: moksnad@mail.ru

Актуальность контроля качества пищевых добавок обусловлена возросшими объемами их фальсификации. В этой связи необходимы новые решения, основанные, в частности, на экстракции целевых компонентов. Отметим, что одно из перспективных направлений жидкостной экстракции связано с применением гидрофильных растворителей, до недавнего времени считавшихся непригодными для экстракции из водных сред вследствие полной или частичной растворимости в воде.

Экстракционное извлечение и электрохимический анализ концентратов позволяют контролировать содержание биологически активных веществ в пищевых добавках на каждой стадии их производства.

Объекты исследования (метионин и фенилаланин) – незаменимые аминокислоты, благотворно влияют на функцию почек и печени, ускоряют переработку жиров, участвуют в биосинтезе ряда важнейших регуляторов жизнедеятельности организма. Комплекс метионина и фенилаланина содержится в составе многих биологически активных добавок на основе аминокислот.

В качестве экстрагентов органических веществ традиционно применяются гидрофобные растворители, эффективность которых по отношению к аминокислотам чрезвычайно мала. Применение гидрофильных растворителей, образующих самостоятельную фазу в присутствии высаливателей, обеспечивает не только высокую степень извлечения, но и возможность селективного определения метионина и фенилаланина в равновесной органической фазе, минуя стадию реэкстракции.

Метионин и фенилаланин экстрагировали из водно-солевого раствора ацетоном, этилацетатом и их смесями. Экстракты анализировали методами потенциометрического и кондуктометрического титрования.

Разработаны теоретические аспекты экстракционных равновесий в системах α-аминокислоты – гидрофильный растворитель (смесь растворителей) – высаливатель – вода. Установлены факторы, влияющие на экстракционные характеристики (коэффициенты распределения, степень извлечения, факторы разделения): строение и свойства распределяемых соединений, физико-химические параметры органических растворителей, состав экстракционной системы, природа и концентрация высаливателя. Методом симплекс–решетчатого планирования эксперимента оптимизирован состав смесей экстрагентов, разработан алгоритм выбора эффективной экстракционной системы для решения конкретной аналитической задачи.

Установлено, что эффективность экстракции метионина и фенилаланина бинарными смесями возрастает по сравнению с экстракцией индивидуальными растворителями. Практически полное (95 – 97 %-ное) извлечение аминокислот достигается при экстракции смесью 0,3 мол. доли ацетона и 0,7 мол. доли этилацетата. При таком соотношении компонентов коэффициенты распределения метионина и фенилаланина в системе насыщенный водно-солевой раствор – смесь гидрофильных растворителей достигает 530 и 470 соответственно, степень однократного извлечения – более 98 %.

DEFINITION OF METHIONINE AND PHENYLALANINE IN BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITIVES

[1]Pakhomova O.A., [2]Mokshina N.Ya., [1]Korenman Ya.I., [1]Niftaliev S.I.

[1] State Technological Academy, Voronezh, Russia
e-mail: korenman@vgta.vrn.ru
[2] Air force Engineer University, Voronezh, Russia
e-mail: moksnad@mail.ru

The urgency of quality assurance of food additives is caused by the increased volumes of their falsification. Thereupon the new decisions based, in particular, on extraction of target components are necessary. We will notice that one of perspective directions liquid extraction is connected with application hydrophilic the solvents which until recently were considered unsuitable for extraction from water environments owing to full or partial solubility in water.

Extraction and the electrochemical analysis of a concentrate allow to supervise the maintenance of biologically active substances in food additives at each stage of their manufacture.

Objects of research (methionine and phenylalanine) concern irreplaceable amino acids, well influence function of kidneys and a liver, accelerates processing of fats, participate in biosynthesis of some the major regulators of ability to live of an organism. The complex of methionine and phenylalanine contains as a part of many biologically active additives on the basis of amino acids.

In quality organic substances the waterproof solvents which efficiency in relation to amino acids is extremely small are traditionally applied. Application hydrophilic the solvents forming an independent phase at presence solvents, provides not only high degree of extraction, but also possibility of selective definition of methionine and phenylalanine in an equilibrium organic phase, passing a stage reecstraction.

Methionine and phenylalanine extracted from a water-salt solution acetone, ethylacetate and their mixes. Extracts has been analyzed by potentiometric and conduktometric titrimetry.

Theoretical aspects of extraction balance in systems α - amino acids – hydrophilic solvent (a mix of solvents) – salting-out agent - – water are developed. The factors influencing on extraction of the characteristic (distribution factors, extraction degree, division factors) are established: a structure and properties of distributed connections, physical and chemical parameters of organic solvents, structure extraction systems, the nature and concentration salting-out agent. The simplex-trellised of planning of experiment is optimized by a method structure of mixes solvents, effective extraction systems the algorithm of a choice is developed for the decision of a concrete analytical problem.

It is established that efficiency extraction methionine and phenylalanine a binary mix increases in comparison with extraction individual solvents. Almost full (95 – 97 % th) extraction of amino acids is reached at extraction by a mix of 0,3 m. д. Acetone and 0,7 m. d. ethylacetate. At such parity of components and phenylalanine in system the sated water-salt solution – the mix гидрофильных solvents reaches factors of distribution of methionine 530 and 470 accordingly, degree of unitary extraction – more than 98 %.

АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ВОДНЫХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ЦИСТ *ARTEMIA SALINA*

Повница О.Ю., Носач Л.Н., [1]Руднева И.И., [1]Шайда В.Г.

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: Povnitsa@mail.ru
[1]Институт биологии южных морей НАНУ, Севастополь, Украина

Аденовирусные заболевания являются широко распространенными патологиями человека, занимая второе место по распространению среди острых респираторных вирусных инфекций после гриппа. До настоящего времени не разработано эффективных специфических препаратов для лечения местных и системных форм аденовирусной инфекции. Также широко распространены заболевания, вызванные вирусом простого герпеса (ВПГ-1). Лечение таких инфекций является серьезной медицинской проблемой. В настоящее время для лечения используются аналоги нуклеозидов (ацикловир, ганцикловир, пенцикловир, цидофовир). Большим недостатком существующих противовирусных препаратов является их токсичность, а постоянной проблемой в лечении больных - появление резистентных вирусов.

Таким образом, важность разработки новых антивирусных средств не вызывает сомнения. Весьма перспективным подходом является скрининг антивирусного действия продуктов, полученных из природных источников, включая морскую фауну и флору, бактерии, грибки и высшие растения.

В представленной работе, изучали антивирусную активность водных экстрактов белков (ЭБ), выделенных из цисты *Artemia salina*, собранных в гиперсоленых крымских озерах, против вируса простого герпеса (ВПГ-1, штамм УС) и аденовируса человека типа 2 (Adh2). Эксперименты проводили in vitro на культуре клеток Hela. Цитотоксическое действие экстрактов на клетоки оценивали с использованием МТТ метода. Антигерпетическую активность ЭБ оценивали по редукции количества специфических вирусных бляшек по сравнению с контролем вируса. Антиаденовирусное действие экстрактов оценивали по уменьшению процента инфицированных клеток, содержащих специфические вирусные внутриядерные включения.

Высокая антивирусная активность экстрактов была отмечена при добавлении их в среду культивирования после адсорбции вирусов на протяжении 1 часа. Было установлено, что ЭБ в концентрации 16 мкг/мл полностью ингибируют репродукцию ВПГ-1, эффективная 50% концентрация концентрация - EC_{50} равна 2,8 мкг/мл. В концентрации 2 мкг/мл ЭБ уменьшали количество инфицированных аденовирусом клеток с внутриядерными включениями на 99%, EC_{50} равна 0,3 мкг/мл, а индекс селективности (SI) составляет 60.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что природные вещества – белковые экстракты из цист *Artemia salina* имеют потенциальную ценность как источник новых соединений, эффективных против аденовируса человека.

ANTIVIRAL ACTIVITY OF WATER EXTRACTS FROM *ARTEMIA SALINA* CYSTS

Povnitsa O.Yu., Nosach L.N., [1]Rudneva I.I., [1]Shayda V.G.

Institute of Microbiology and Virology NASU, Kyiv, Ukraine
e-mail: Povnitsa@mail.ru
[1]Institute of Biology of the Southern Seas NASU, Sevastopol, Ukraine

Adenoviral infection is a widely distributed human pathology and takes the second place for its spread among acute respiratory infections after influenza. So far, no specific and effective medicines have yet been developed for the treatment of local and systemic forms of adenoviral infection. The diseases caused by Herpes simplex virus (HSV-1) are widely distributed. Treatment of these infections is the most significant medical problem. At present for the treatment of these diseases nucleoside (acyclovir, ganciclovir, penciclovir, cidofovir) analogues are used. However, the appearance of resistant virus is current problem in the treatment of patients and deficiency in the antiviral preparations caused their toxicity.

Therefore, it is very important to develop new antiviral drugs against this virus. Very promising approach is the antiviral screening of products derived from natural sources including marine fauna and flora, bacteria, fungi, and green plants.

We have studied the anti-viral activity against Herpes simplex virus (HSV-1, strain US) and Human adenovirus type 2 (Adh2) of the protein extracts (PE) which were produced from *Artemia* cysts collected in Crimean hyper saline lakes. Anti-viral experiments were performed in vitro on *Hela* cells. The toxicity of each test extract to Hela cells was evaluated in MTT methods. PE was tested for antiviral activity against HSV-1 by a plaque reduction assay. The rate of Adh2 like viral reproduction inhibition was evaluated by the decrease percentage of the cells with specific viral intra-nuclear inclusions.

The highest inhibitory effect was observed when PE was added to cells immediately after absorption of viruses at 1h.p.i. It was determined that PE in concentration of 16μg/ml inhibited the reproduction of HSV-1, EC_{50} of PE was 2.8 μg/ml, and selectivity index (SI) was 7. PE in concentration 2 μg/ml decreased the number of infected Adh2 cells with intranuclear inclusions on 99%, EC_{50} of PE was 0.3 μg/ml, SI was 60.

These results suggest that PE have a potential value as a source of new effective compounds against human adenovirus.

РАЗРАБОТКА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ СУБСТАНЦИЙ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ С ПОВЫШЕННОЙ БИОДОСТУПНОСТЬЮ МЕТОДОМ ФОРМИРОВАНИЯ НАНОСТРУКТУРНЫХ И КОМПЛЕКСНЫХ ФОРМ АКТИВНОГО КОМПОНЕНТА

Пытлев С.И., Анисович М.В., Афонин В.Ю., Шилов В.В., Забело О.И., Кардаш О.Ф., Турлюк Д.В.

ГУ НПЦ «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
e-mail: farmacia@it.org.by; cardiopharmacology@tut.by

Основным препятствием для широкого использования растительных полифенолов в составе лекарственных средств является их низкая растворимость в водных средах и, соответственно, низкая биодоступность.

Целью настоящей работы явилась разработка способов получения фармакологических субстанций с повышенной биодоступностью на основе растительных полифенолов методами стабилизации наночастиц активного компонента в водных композициях с использованием неионогенных поверхностно-активных веществ (ПАВ), а также формирования водных комплексных форм активного компонента и нетоксичных композиций органических соединений.

Получены данные о влиянии температуры, осаждающих реагентов, концентрации и составе исходных растворов полифенолов, экстрагированных из растений семейств *Zingiberaceae* и *Fabaceae,* на кинетические особенности формирования наноструктур активного компонента, агрегационную устойчивость и химическую стабильность полученных субстанций. Показано, что при содержании полифенола до 2% масс. и концентрации ПАВ в интервале 0,1-0,3% масс. при определенном соотношении реагирующих растворов формируется устойчивый к агрегации и химически стабильный золь полифенолов.

Методом оптической спектрометрии зафиксировано увеличение области поглощения и смещение максимумов, связанное с образованием водорастворимых комплексов. Установлено, что независимо от природы реагентов, активные компоненты и исследованные ПАВ реагируют в эквимолярных соотношениях. Найдены оптимальные соотношения компонентов и режимы синтеза водорастворимых комплексов, позволяющие существенно повысить содержание активных компонентов в водных растворах. Получены данные об агрегационной устойчивости и химической стабильности полученных композиций.

Была исследована фармакологическая перспективность различных комбинаций растительных полифенолов посредством оценки *in vivo* и *in vitro* их цитостатических и вазоактивных свойств. Показано, что цитостатическая активность субстанций в МТТ тесте на линии клеток рака легкого (А549) зависит от размера частиц активного компонента в стабилизированной композиции и максимальна в случае использования преимущественно наноразмерных структур полифенолов. Субстанции на основе водорастворимых комплексов полифенолов растения семейства *Zingiberaceae* показали цитостатическую активность на уровне нанодисперсных композиций, большую агрегационную устойчивость и возможность достижения более высоких концентраций активного компонента в сравнении с полифенолами семейства *Fabaceae*.

Сравнительные исследования влияния полифенолов в наномолекулярной форме на функцию сосудов различной локализации (лучевая артерия, внутренняя грудная артерия, большая подкожная вена), изолированных у человека и крыс, показали, что водорастворимые полифенолы растения семейства *Zingiberaceae* обладают выраженными вазодилатирующими свойствами в диапазоне доз 1-10 мкМ. Показана способность данных соединений предотвращать спазм сосудов, индуцированный норадреналином (10-5 М) и хлоридом калия (75 мМ).

У крыс с генетически детерминированной артериальной гипертензией зафиксирован значительный гипотензивный эффект при интрагастральном введении водорастворимых комплексов полифенолов изучаемых растений.

Следовательно, дальнейшее совершенствование технологии получения фармакологических субстанций с повышенной биодоступностью на основе растительных полифенолов является перспективной для разработки лекарственных средств нового поколения.

DEVELOPMENT OF PHARMACOLOGICAL SUBSTANCES ON THE BASIS OF PLANT POLYPHENOLS WITH THE INCREASED BIOAVAILABILITY DUE TO FORMATION OF NANOSTRUCTURAL AND COMPLEX FORMS OF AN ACTIVE COMPONENT

Pytlev S.I., Anisovich M.V., Afonin V.Y., Shilov V.V., Zabelo O.I., Kardash V.F., Turluk D.V.

Institute of pharmacology and biochemistry of NAS of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: farmacia@it.org.by; cardiopharmacology@tut.by

The main obstacle for wide use of plant polyphenols in pharmacology is their low solubility in water and accordingly low bioavailability.

The purpose of the present issue was development of method for pharmacological substances creation with increased bioavailability on the basis of plant polyphenols by stabilization of active component nanoparticles in water with no-ion surface-active substances (SAS), and also formation of water soluble forms of an active component with nontoxic organic compositions.

Influence of the temperature, besieging reagents concentration and structure of initial polyphenol solutions, extracted from plants *of Zingiberaceae* and *Fabaceae families* on kinetic features of an active component nanoform, aggregation and chemical stability of the received substances are obtained. It is shown, that formation of aggregation and chemically stable polyphenol zol occurs if the polyphenol maintenance is up to 2% of the reacting solution weights and concentration of SAS is in an interval of 0.1-0.3% of the ones weights.

The optical spectrometry fixes increase of absorption area and the maxima displacement due to formation of water-soluble complexes. It is established, that irrespective of the nature of reagents, active components and investigated SAS react equimolarly. Optimum parities of components and modes of synthesis of the water-soluble complexes are found. This allows essentially increase the maintenance of active components in water solutions. Aggregation and chemical stability of the received compositions are obtained.

Cytostatic and vasoactive properties of various combinations of plant polyphenols has been investigated in vivo and in vitro. It is shown, that cytostatic activity of substances in the MTT test on the lung cancer cells lines (A549) depends on the size of active component particles in the stabilized composition and is maximal in case of use mainly nano structures of polyphenols. Substances of water-soluble Zingiberaceae polyphenols complexes have shown cytostatic activity in a nanodispersion compositions, greater aggregation stability and the higher concentration of an active component than the *Fabaceae ones*.

Comparative researches of polyphenol nanomolecular form influence on function of different vessels (radialis artery, internal thoracic artery and the vena saphena magna) isolated from men and rats are established expressed vasodilating properties of water-soluble polyphenols from the Zingiberaceae plants in a range of dozes 1-10 μM. It is revealed prevention of angiospasm induced by epinephrine (10^{-5}) and potassium chloride (75 mM). Significant hypotension effect in rats with genetic determined arterial hypertension is demonstrated at per os introduction of water-soluble polyphenol complexes from studied plants.

Thus the further development of pharmacological substances reception technology from plant polyphenols with the increased bioavailability is perspective for creation of new generation drugs.

ХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ *EUPHORBIA FRANCHETII B.FEDTSCH*

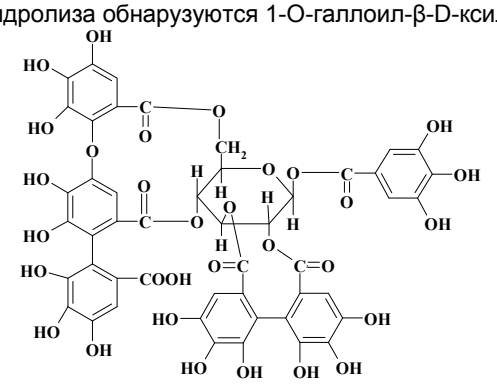
Рахимов Р.Н., Абдулладжанова Н.Г., Мавлянов С.М.

Институт биоорганической химии АН РУз, Ташкент, Узбекистан
e-mail: rahimov_r_n@mail.ru

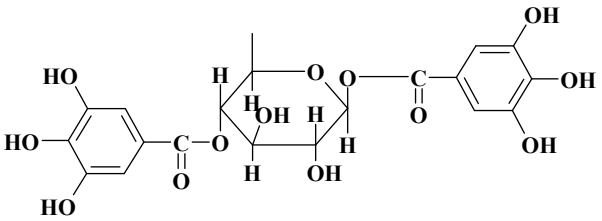
Среди важнейших классов природных соединений, обуславливающих лечебный эффект лекарственных растений, значительное место занимают полифенолы. Широкий спектр биологического действия и малая токсичность ставит их в ряд перспективных в этом плане соединений. Поэтому поиск растений, содержащих полифенолы, разработка методов их выделения, установление их химической структуры и изучение зависимости фармакологической активности от химической структуры с целью создания новых эффективных лекарственных препаратов является важной и актуальной проблемой современной биоорганической химии. Исходя из этого, нами были изучены полифенолы Euphorbia franchetii. Последовательной обработкой измельченного растительного сырья хлороформом, водным ацетоном, выпаркой водно-ацетонового экстракта под вакуумом, исчерпывающей обработкой водного остатка этилацетатом, добавлением к концентрированой этилацетатной вытяжке хлороформа был выделен комплекс фенольных соединений. Полученный комплекс был подвергнуты хроматографическому разделению на колонках с гольевым порошком, силикагелем с использованием различных систем растворителей. При этом были выделены ряд соединений в индивидуальном состоянии. По физико-химическим свойствам часть из этих соединений были идентифицированы с известными веществами]. Два из них оказались новыми, ранее не описанными в литературе веществами – гидролизуемыми таннинами. В данной работе мы представляем результаты исследования их структуры.

1-О-галлоил-2,3-гексагидрокси-дифеноил-4,6-валонеил-β-D-глюкоза (1)- аморфный порошок желтого цвета, $T_{пл}$257-258 ^{0}C (с разлож.), УФ -спектр (λ_{max}, EtOH, нм): 220, 280. ИК-спектр (ν_{max} KBr, см$^{-1}$): 3300-3400 (OH), 1620-1610,1450 (Ar), 1320 (-C-OH), 1250, 1045 (-C-O-C), 1080-1070 (C-O), 1040, 1010 (сахарная часть). ПМР-спектр (200 МГц, Me_2CO-d_6, δ, м.д.): 6.39 (1H, д, J=4.0, Гц, глюк.H-1), 5.66 (1H, дд, J=4, 10, Гц, глюк.H-2), 6.06 (1H, т, J=10, Гц, глюк.H-3), 5.70 (1H, т, J=10, Гц, глюк.H-4), 4.60 (1H, м, J=7, 13, Гц, глюк.H-5), 4.45 (2H, дд, J=13, Гц, глюк.H-6), 6.75, 6.73, 6.68, 6.63 (H, галлоил-гр), 6.84, 6.70 (H, гексагидроксидифеноил-гр), 7.57, 7.55, 7.10, 6.98, 6.57, 6.56 (H, валонеил-гр). ЯМР ^{13}C (50 МГц, Me_2CO-d_6, δ, м.д.): глюкоза: 94.2 (C-1), 70.9 (C-2), 65.3 (C-3), 67.2 (C-4), 64.3 (C -5), 65.4 (C-6); галлоил. гр: 125.9 (C-1), 110.9 (C-2), 145.8 (C-3), 136.0 (C-4), 145.8 (C-5), 110.9 (C-6), 167.0 (C-7); гексагидрокси дифеноил: 119.0 (C-1), 124.8 (C-2), 111.4 (C-3), 144.7 (C-4), 136.65 (C-5), 144.7 (C -6), 167.0 (C-7), 119.0 (C-1`), 144.7 (C-2′), 136.5 (C-3′), 144.7 (C-4′), 111.4 (C-5′), 124.8 (C-6′), 167.0 (C-7 ′); валонеил. гр: 119.0 (C-1), 124.8 (C-2), 111.4 (C-3), 144.7 (C-4), 136.5 (C-5), 114.7 (C-6), 167.0 (C-7), 119.5 (C-1′), 123.1 (C-2′), 113.0 (C-3′), 143.5 (C-4′), 138.1 (C-5′), 143.0 (C-6′), 167.0 (C-7′), 114.8 (C-1″), 138.9 (C-2″), 134.6 (C-3″), 136.6 (C-4″), 138.9 (C-5″), 111.0 (C-6″), 172.0 (C-7″). В результате кислотного гидролиза образуются глюкоза, гексагидрокси-дифеноильная, галловая и валоневая кислоты. А в результате последовательного гидролиза обнаруживаются 1-О-галлоил-β-D-глюкоза, 2,3-гексагидрокси-дифеноил-β-D-глюкоза, 4,6-валонеил-β-D-глюкоза.

1,4-ди-О-галлоил-β-D-ксилоза (2)- белый аморфный порошок, $T_{пл}$182-183 ^{0}C (с разлож.), УФ -спектр (λ_{max}, EtOH, нм): 214, 286. ИК-спектр (ν_{max} KBr, см$^{-1}$): 3500-3200 (OH), 2935, 1495 (-CH-, -CH_2), 1625, 1545,1510, 1435 (Ar), 1270-1040 (=C-O-C). ПМР-спектр (200 МГц, Me_2CO-d_6, δ, м.д.): ксилоза: 3.63 (1H, d, J=1.4, Гц, ксилоза. H-1), 3.32 (1H, m, J=2.1, Гц, ксилоза. H-2), 3.07 (1H, m, J=7.7, Гц, ксилоза. H-3), 3.30 (1H, m, J=2.0, Гц, ксилоза. H-4), 3.58 (1H, m, J= 8.5, Гц, ксилоза. H-5), 6.97, 7.02, 7.08, 7.09 (H, галлоил-гр). ЯМР ^{13}C (50 МГц, Me_2CO-d_6, δ, м.д.): ксилоза: 93.6 (C-1), 70.9 (C-2), 61.6 (C-3), 77.0 (C-4), 87.5 (C-5); галлоил. гр: 125.9 (C-1), 110.9 (C-2), 145.8 (C-3), 136.0 (C-4), 145.8 (C-5), 110.9 (C-6), 167.0 (C-7). В результате кислотного гидролиза образуются ксилоза и галловая кислота. А в результате последовательного гидролиза обнаруживаются 1-О-галлоил-β-D-ксилоза, 4-О-галлоил-β-D-ксилоза.



1



2

STUDY OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS OF *EUPHORBIA FRANCHETII B.FEDTSCH*

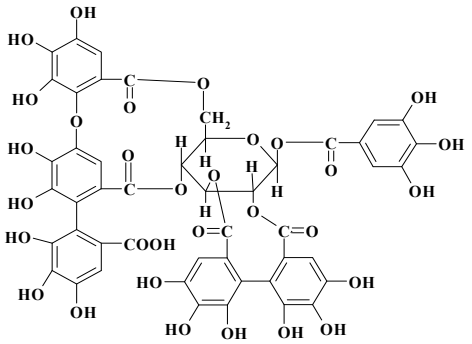
Rakhimov R.N., Abdulladjanova N.G., Mavlyanov S.M.

A.S.Sadykov Institute of Bioorganic chemistry of Academy of Sciences of Republic of Uzbekistan,
e-mail: rahimov_r_n@mail.ru

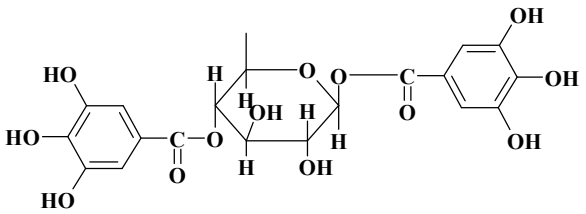
Polyphenols occupy the considerable place among the major classes of the natural compounds of plants causing medical effect. The wide spectrum of biological action and small toxicity determine their perspective use in this plan. Therefore search of the polyphenols containing plants, working out the isolation methods of them, establishing their chemical structure and studying connection between their pharmacological activities and chemical structure with the purpose of creation of new effective medical products is the important and actual problem of modern bioorganic chemistry. With this intent, we had studied polyphenols of Euphorbia franchetii. Complex of phenolic compounds was isolated working on crushed vegetative materials with chloroform, water acetone, evaporated water-acetone extract under the vacuum, processing of the water residue extracted with EtOAc. The received sums of substances have been subjected chromatographic partition in columns with silica gel powder and compounds were separated, using various systems of solvents. Thus some individual compounds were isolated. Learning physico-chemical properties of these compounds they were identified with known substances. As the results show, two of these compounds were new, they were not described in literatures - hydrolyzed tannins. In the given work we represent results of spectrum analysis of their structures.

1-O-galloyl-2,3-hexahydroxydiphenoyl-4,6- valoneoyl -β-D-glucose (1)- a pale yellow amorphous powder, with the melting point of 257-258 ^{0}C, UV spectrum (λ_{max}, C_2H_5OH, nm) 220, 280. IR spectrum (ν_{max}, KBr, cm^{-1}): 3300-3400 (OH), 1620-1610,1450 (Ar), 1320 (-C-OH), 1250, 1045 (-C-O-C), 1080-1070 (C-O), 1040, 1010 (sugar part). NMR-spectrum (200 MHz, Me_2CO-d_6, ppm) δ: 6.39 (1H, d, J=4 Hz, glucose H-1), 5.66 (1H, dd, J=4,10, Hz, glucose H-2), 6.06 (1H, т, J=10 Hz, glucose H-3), 5.70 (1H, t, J=10 Hz, glucose H-4), 4.60 (1H, m, J=7, 13 Hz, glucose H-5), 4.45 (2H, dd, J= 13 Hz, glucose H-6), 6.75, 6.73, 6.68, 6.63 (galloyl group), 7.57, 7.55, 7.10, 6.98, 6.57,6.56 (H, valoneoyl gr), 6.84, 6.70 (H, hexahydroxydiphenoyl-gr). NMR ^{13}C (50 MHz, Me_2CO-d_6, ppm) δ: 94.2 (C-1, glucose), 70.9 (C-2), 65.3 (C-3), 67.2 (C-4), 64.3 (C-5), 65.4 (C-6); galloyl group:125.9 (C-1), 110.9 (C-2), 145.8 (C-3), 136.0 (C-4), 145.8 (C-5), 110.9 (C-6), 167.0 (C-7); hexahydroxydiphenoyl: 119.0 (C-1), 124.8 (C-2), 111.4 (C-3), 144.7 (C-4), 136.65 (C-5), 144.7 (C -6), 167.0 (C-7), 119.0 (C-1`), 144.7 (C-2′ ), 136.5 (C-3′ ), 144.7 (C-4′ ), 111.4 (C-5′ ), 124.8 (C-6′ ), 167.0 (C-7 ′ ); valoneoyl gr: 119.0 (C-1), 124.8 (C-2), 111.4 (C-3), 144.7 (C-4), 136.5 (C-5), 114.7 (C-6), 167.0 (C-7), 119.5 (C-1`), 123.1 (C-2`), 113.0 (C-3`), 143.5 (C-4`), 138.1 (C-5`), 143.0 (C-6`), 167.0 (C-7`), 114.8 (C-1``), 138.9 (C-2``), 134.6 (C-3``), 136.6 (C-4``), 138.9 (C-5``), 111.0 (C-6``), 172.0 (C-7``). As the results of acidic hydrolysis there formed glucose, hexahydroxydiphenoyl, gallic acid valoneic acids. In further sequential hydrolysis it was formed 1-O-galloyl-β-D-glucose, 2.3-hexahydroxydiphenoyl-β-D-glucose, and 4,6-valoneoyl-β-D-glucose. On the basis of the above given data the structure of the new compound was determined as

1,4-di-O-galloyl-β-D- xylose (2)- a white amorphous powder with the melting point of 182-183 ^{0}C (with decomposition), UV - spectrum (λ_{max}, C_2H_5OH, nm): 214, 286. IR spectrum (ν_{max}, KBr, $см^{-1}$): 3500-3200 (OH), 2935, 1495 (-CH-, -CH_2), 1625, 1545,1510, 1435 (Ar), 1270-1040 (=C-O-C). ^{1}H NMR (200 МГц, Me_2CO-d_6, ppm) δ: xylose: 3.63 (1H, d, J=1.4, Hz ,H-1), 3.32 (1H, m, J=2.1, Hz , H-2), 3.07 (1H, m, J=7.7, Hz , H-3), 3.30 (1H, m, J=2.0, Hz , H-4), 3.58 (1H, m, J= 8.5, Hz, H-5), 6.97, 7.02, 7.08, 7.09 (H, galloyl group). ^{13}C NMR (50 МГц, Me_2CO-d_6, ppm) δ: xylose: 93.6 (C-1), 70.9 (C-2), 61.6 (C-3), 77.0 (C-4), 87.5 (C-5); galloyl group: 125.9 (C-1), 110.9 (C-2), 145.8 (C-3), 136.0 (C-4), 145.8 (C-5), 110.9 (C-6). As the results of acidic hydrolysis there formed csiloza and gallic acid. In further sequential hydrolysis it was formed 1-O-galloyl-β-D-xylose and 4-O-galloyl-β-D-xylose



1



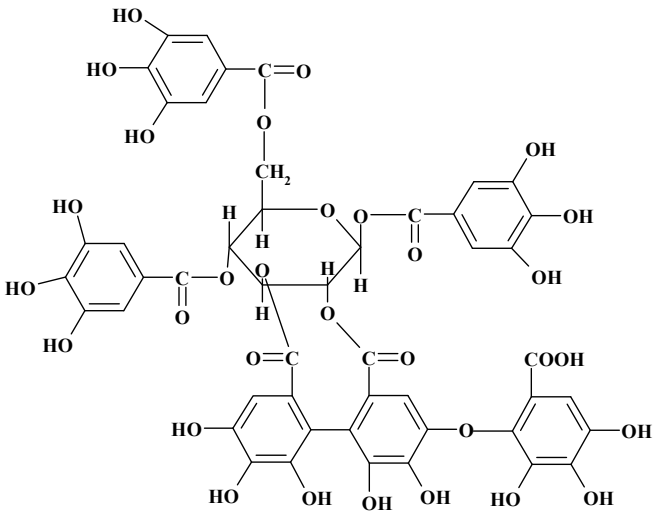
2

НОВЫЙ ТАННИН, ВЫДЕЛЕННЫЙ ИЗ *EUPHORBIA CANESCENS L.*

Рахимов Р. Н., Абдулладжанова Н.Г., Мавлянов С.М.

Институт биоорганической химии АН РУз, Ташкент, Узбекистан
e-mail: ibchem@uzsci.net

Изучен полифенольный состав растения Euphorbia canescens L. При изучении выделены вещества, которые были известны по литературнымм данным, а также обнаружено новое соединения. Новое соединение было в аморфном состоянии и обладал коричневым цветом. Т пл 253-254 ^{0}C (с разлог.), УФ-спектр (λ_{max}, C_2H_5OH, нм) 225, 290. ИК-спектр (, v_{max}, KBr, см$^{-1}$): 3300-3400 (OH), 1620-1610,1450 (Ar), 1320 (-C-OH), 1250, 1045 (-C-O-C), 1080-1070 (C-O), 1040, 1010 (сахарная часть). ПМР-спектр (200 МГц, δ, ацетон-d_6, м.д.): 4.87 (1H, д, J=8 Гц, глюк. H-1), 3.62 (1H, дд, J=8 ,10, Гц, глюк. H-2), 5.51 (1H, т, J=10 Гц, глюк H-3), 5.34 (1H, т, J=10 Гц, глюк H-4), 4.12 (1H, дд, J=7, 13 Гц, глюк H-5), 4.40 (2H, дд, J= 7, 13 Гц, глюк H-6), 7.18, 7.15, 7.10, 7.04, 7.00 (H, галлоил гр.), 6.15, 6.13, 6.09, 6,06 (H, валонеил гр). ЯМР ^{13}C (50 МГц, ацетон-d_6, м.д.): 94.2 (C-1, глюкоза), 70.9 (C-2), 65.3 (C-3), 67.2 (C-4), 64.3 (C-5), 65.4 (C-6); галлоил. гр:125.9 (C-1), 110.9 (C-2), 145.8 (C-3), 136.0 (C-4), 145.8 (C-5), 110.9 (C-6), 167.0 (C-7); валонеил. гр:119.0 (C-1), 124.8 (C-2), 111.4 (C-3), 144.7 (C-4), 136.5 (C-5), 144.7 (C-6), 167.0 (C-7), 119.5 (C-1`), 123.1 (C-2`), 113.0 (C-3`), 1463.5 (C-4`), 138.1 (C-5`), 143.0 (C-6`), 167.0 (C-7`), 114.8 (C-1``), 138.9 (C-2``), 134.6 (C-3``), 136.6 (C-4``), 138.9 (C-5``), 111.0 (C-6``), 172.0 (C-7``). В результате кислотного гидролиза обнаружились глюкоза, галловая и валоневая кислоты. А в результате последовательного гидролиза обнаружились 1-О-галлоил-β-D-глюкоза, 4-О-галлоил-β-D-глюкоза, 6-О-галлоил-β-D-глюкоза и 2,3-валонеил-β-D-глюкоза. На основании вышеприведенных данных структура нового соединения определена как 1,4,6-три-О-галлоил-2,3-валонеил-β-D-глюкоза.



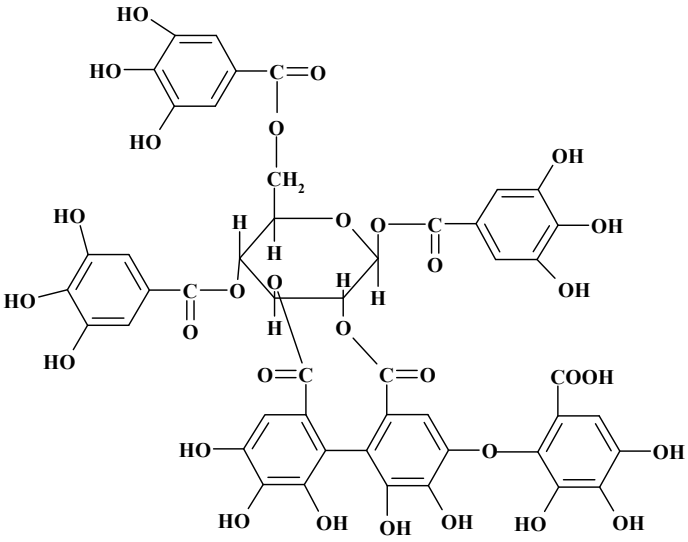
1,4,6-три-О-галлоил-2,3-валонеил-β-D-глюкоза

NEW TANNIN ISOLATED FROM *EUPHORBIA CANESCENS L.*

Rakhimov R.N., Abdulladjanova N.G., Mavlyanov S.M.

A.S.Sadykov Institute of bioorganic chemistry, Academy of Sciences Republic of Uzbekistan
e-mail: ibchem@uzsci.net

The chemical composition of Euphorbia canescens L. has been studied. While exploring some compounds were isolated. Among them, there were already known compounds and new one. That compound is amorphous compound of brown color, with the melting point of 253-254 ^{0}C, UV spectrum (λ_{max}, C_2H_5OH, nm) 225, 290. IR spectrum (ν_{max}, KBr, cm^{-1}): 3300-3400 (OH), 1620-1610,1450 (Ar), 1320 (-C-OH), 1250, 1045 (-C-O-C), 1080-1070 (C-O), 1040, 1010 (sugar part). NMR-spectrum (200 MHz, δ, ацетон-d_6, ppm): 4.87 (1H, d, J=8 Hz, glucose H-1), 3.62 (1H, dd, J=8 Hg, 10, glucose H-2), 5.51 (1H, т, J=10 Hg, glucose H-3), 5.34 (1H, t, J=10 Hz, glucose H-4), 4.12 (1H, dd, J=7, 13 Hz, glucose H-5), 4.40 (2H, dd, J= 7, 13 Hz, glucose H-6), 7.18, 7.15, 7.10, 7.04, 7.00 (galloyl group), 6.15, 6.13, 6.09, 6,06 (H, valoneoyl gr). NMR ^{13}C (50 MHz, acetone-d_6, ppm): 94.2 (C-1, glucose), 70.9 (C-2), 65.3 (C-3), 67.2 (C-4), 64.3 (C-5), 65.4 (C-6); galloyl group:125.9 (C-1), 110.9 (C-2), 145.8 (C-3), 136.0 (C-4), 145.8 (C-5), 110.9 (C-6), 167.0 (C-7); valoneoyl gr: 119.0 (C-1), 124.8 (C-2), 111.4 (C-3), 144.7 (C-4), 136.5 (C-5), 144.7 (C-6), 167.0 (C-7), 119.5 (C-1`), 123.1 (C-2`), 113.0 (C-3`), 1463.5 (C-4`), 138.1 (C-5`), 143.0 (C-6`), 167.0 (C-7`), 114.8 (C-1``), 138.9 (C-2``), 134.6 (C-3``), 136.6 (C-4``), 138.9 (C-5``), 111.0 (C-6``), 172.0 (C-7``). In a result of acidic hydrolysis glucose, gallic and valoneic acids were formed. In a result of step by step hydrolysis 1-O-galloyl-β-D-glucose, 4-O-galloyl-β-D-glucose, 6-O-galloyl-β-D-glucose and 2,3- valoneoyl-β-D-glucose were formed. On the basis of above given data the structure of the new compound is determined as 1,4,6-three-O-galloyl-2,3- valoneoyl -β-D-glucose.



1,4,6-three-O-galloyl-2,3- valoneoyl -β-D-glucose

ПЕПТИДНЫЙ СОСТАВ ЭКСТРАКТОВ СЕРДЦА ЖИВОТНЫХ

Рогоза Л.А., Бабаева А.Г., Чиж Н.А., Дюбко Т.С., Гальченко С.Е., Сандомирский Б.П.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Проблема профилактики и лечения инфаркта миокарда по прежнему остается актуальной задачей. Значительный интерес представляет также разработка патогенетически обусловленных подходов к управлению этими процессами.

В настоящее время известно о специфичности процессов образования пептидов в органах и тканях, и что получаемый *in vivo* набор пептидов представляет собой уникальный органоспецифический (в норме и, возможно, при соответствующих патологических состояниях) набор пептидов. Также нами показано, что экстракты криоконсервированных фрагментов органов свиней и поросят (селезенки, печени, поджелудочной железы, кожи) нормализуют процессы репарационной регенерации при соответствующих патологических состояниях в эксперименте и клинике.

Целью данной работы было изучить пептидный состав экстрактов криоконсервированных фрагментов сердца половозрелых свиней и новорожденных поросят, а также фрагментов сердца молодых и взрослых крыс.

Эксперименты проведены в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренных III Национальным конгрессом по биоэтике (2007г, Киев, Украина) и согласованных с положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других научных целях” (Страсбург, 1985г).

Экстракт получали из криоконсервированнх фрагментов сердца свиней и поросят и фрагментов сердца крыс путем их инкубирования в физиологическом растворе 60 мин. Полученные экстракты фильтровали и освобождали от термолабильных белков. Для определения молекулярно-массового распределения низкомолекулярных фракций пептидной природы использовали метод высокоэффективной гельпроникающей хроматографии. Измерения спектров флуоресценции выполнялись на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (Австралия).

В результате выполнения работы были получены хроматограммы и проанализированы спектры молекулярно-массового распределения веществ пептидной природы в исследованных экстрактах. Охарактеризованы общие для всех экстрактов пики на хроматограммах, а также отмечены различия в спектрах распределения пептидов в зависимости от вида животных и их возраста.

Спектры флуоресценции экстрактов находятся в области 290–450 нм. При возбуждении светом с длиной волны 280 нм максимум спектров флуоресценции находится в области 340–354 нм, что может свидетельствовать о наличии в экстрактах доступных растворителю или находящихся в свободном состоянии остатков триптофана.

Наблюдаемые отличия в спектрах флуоресценции экстрактов свидетельствуют о том, что в их состав входят пептиды и непептидные компоненты, различающиеся как по своему количественному соотношению, так и по аминокислотному составу. Получены также синхронные спектры экстрактов, которые могут быть использованы при идентификации и стандартизации экстрактов при изучении их биологической активности.

PEPTIDE COMPOSITION OF ANIMAL HEART EXTRACTS

Rogoza L.A., Babayeva A.G., Chizh N.A., Dyubko T.S., Galchenko S.E., Sandomirsky B.P.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Kharkov, Ukraine
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Prevention and treatment of myocardial infarction still poses a pressing problem. Elaboration of pathogenic approaches to control over these processes is also of considerable and immediate interest.

Currently the processes of peptide formation in the organs and tissues are known to be of a specific nature, and the complement of peptides, harvested *in vivo*, is unique and organ-specific (during normal and probably some pathological states). We have also shown the extracts of the cryopreserved fragments of the organs of mature and young pigs (spleen, liver, pancreas, skin) to normalize the processes of reparative regeneration during the corresponding pathological states in clinical and experimental practice.

The aim of the given research was to investigate peptide compositions of the extracts of the cryopreserved heart fragments of mature and newborn pigs and of the heart fragments of young and mature rats.

The experiments were conducted in accordance with “The general principles of experiments with animals”, adopted by the III National Congress on Bioethics (Kiev, Ukraine, 2007) and coordinated with the provisions of the “European convention on the protection of vertebrate animals being used for experimental and other scientific purposes” (Strasbourg, 1985).

The extracts were harvested from the cryopreserved heart fragments of mature and young pigs and from the heart fragments of rats by incubating them in a physiological saline for 60 min. The extracts thus obtained were filtered, and thermolabile proteins were eliminated from them. A method of high-performance size-exclusion chromatography was applied for determining molecular-mass distribution of the low-molecular fractions of a peptide origin. The fluorescent spectra were measured with a Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter (made in Australia).

The experiments conducted permitted to obtain the chromatograms and to analyze the spectra of molecular-mass distribution of the substances of a peptide origin within the studied extracts. The peaks, common for all the extracts in the chromatograms, were characterized, and the differences in the peptide distribution spectra, depending on the species of the animals or their age, were reported.

The fluorescence spectra of the extracts were in the range of 290–450 nm. Upon excitation with the light wave length of a 280 nm the fluorescent spectra maximums were in the range of 340–354 nm, which could be indicative of the presence of free or solvent-accessible tryptophan residues.

The observed differences in the fluorescence spectra of the extracts testified to their incorporating peptide and non-peptide components, varying both in their quantitative ratios and amino acid compositions. The synchronous spectra of the extracts were also obtained, which could be used for identification and standardization of extracts when studying their biological activity.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОЧИЩЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ГЛЮКОЗООКСИДАЗ ГРИБОВ РОДА *PENICILLIUM*

Семашко Т.В., Михайлова Р.В., Демешко О.Д.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: enzyme@mbio.bas-net.by

Глюкозооксидаза (КФ 1.1.3.4) – один из практически значимых ферментов, катализирующий реакцию окисления глюкозы с образованием пероксида водорода и D-1,5-глюконолактона.

Глюкозооксидаза (ГО) используется для определения концентрации глюкозы в биологических жидкостях в медицинской диагностике. Также глюкозные анализаторы применяются в промышленности для детекции глюкозы в пищевых продуктах и для мониторинга ферментационных процессов. В химической промышленности фермент необходим для производства глюконовой кислоты, ее солей и гидрохинона, в пищевой промышленности ГО используется в качестве консерванта.

Ранее в лаборатории ферментов выделены продуценты внеклеточных ГО: *Penicillium adametzii* и *P. funiculosum* [1, 2]. В настоящее время разрабатываются технологии получения препаратов глюкозооксидаз различной степени очистки на основе вышеуказанных грибов.

Цель данного исследования – оценить возможность использования сорбентов DEAE-Sepharose^{tm} Fast Flow (США), DEAE- и Q-ceramic (Германия) для получения очищенных препаратов глюкозоокисляющего фермента методом ионообменной хроматографии.

В экспериментах использовали:

1) фильтраты культуральных жидкостей: *P. adametzii* (активность ГО – 8,7-9,1 ед/мл, удельная активность – 89-90 ед/мг белка, редуцирующие вещества (РВ) – 10 мг/мл) и *P. funiculosum* (активность ГО – 16-17,08 ед/мл, удельная активность – 85-88 ед/мг белка, РВ – 30 мг/мл);

2) концентраты, полученные методом ультрафильтрации фильтратов культуральных жидкостей грибов на мембранах с номинально минимальным массовым пределом задерживания 10 кДа (*P. adametzii:* активность ГО – 1115,7 ед/мл, удельная активность – 80 ед/мг белка, РВ – 0 мг/мл, и *P. funiculosum*: активность ГО – 1209,9 ед/мл, удельная активность – 76 ед/мг белка, РВ– 0 мг/мл).

На колонки, заполненных сорбентами, (1×10 см) наносили 60-70 мг белка, элюцию осуществляли 0,01 М калий-фосфатным буфером (pH 6,0) путем создания линейного солевого градиента NaCl (0,0-0,5 М).

Установлено, что при прохождении фильтратов культуральных жидкостей грибов через колонку фермент не связывался с сорбентами. Возможно, это обусловлено наличием в фильтратах глюкозы и, как следствие, нарушением электростатического взаимодействия между ферментом и сорбентами.

Для дальнейших исследований использовался концентрат ГО, не содержащий РВ. Электрофоретический анализ концентратов ГО, полученных методом ультрафильтрации, показал наличие в препаратах, наряду с доминирующей зоной ГО, минорных полос (10-15 шт.) сопутствующих белков.

Показано, что фермент прочно связывался с сорбентами и легко десорбировался в градиенте NaCl. Значительное количество баластных белков (до 24 мг) элюировалось в первых фракциях (~0,02-0,05 М NaCl), а ГО – в последующих (~0,07-0,2 М NaCl).

При этом ГО *P. adametzii* выходила одним (сорбент – DEAE-Sepharose^{tm} Fast Flow) или тремя пиками (сорбенты – DEAE- и Q-ceramic). Удельная активность во фракциях составляла 21,5-153,6 ед/мг белка. Наилучший результат отмечен при использовании в качестве сорбента DEAE-ceramic. Удельная активность фермента, десорбированного ~ 0,1-0,12 М NaCl (3-ий пик), составила 148,9-153,6 ед/мг белка, степень очистки – 1,9 раз. Электрофоретический анализ препарата ГО *P. adametzii* с максимальным значением по удельной активности показал наличие трех минорных полос сопутствующих белков наряду с доминирующей полосой ГО.

В результате хроматографии ГО *P. funiculosum* в случае использования в качестве сорбентов DEAE-Sepharose^{tm} Fast и Q-ceramic выявлено 3 пика, содержащих фермент, а при применении DEAE-ceramic – 4. Удельная активность во фракциях составляла 29,8-253,9 ед/мг белка. Лучшим сорбентом, обеспечивающим получение препарата ГО *P. funiculosum* с максимальной удельной активностью, также является DEAE-ceramic. Согласно электрофоретическому анализу, часть ГО, элюированная ~ 0,09-0,13 М NaCl (1-3 пик), содержала 2-3 минорные полосы балластных белков, а фермент (4-ий пик), выходящий в последующих фракциях (~0,15-0,17 М NaCl), характеризовался гомогенностью. Степень очистки препарата ГО с удельной активностью 248,9-253,9 ед/мг белка составила 3,3 раза.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов подобран эффективный сорбент (DEAE-ceramic) для получения очищенных препаратов ГО грибов рода *Penicillium* с высокой удельной активностью 148,9- 253,9 ед/мг белка, содержащих минимальное количество балластных белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда фундаментальных исследований Республики Беларусь (проект Б11ЛИТ-012).

Литература:

1.*Р.В. Михайлова, Л.А. Жуковская, А.Г. Лобанок* // Изучение спонтанной изменчивости *Penicillium adametzi*i ЛФ F-2044 – продуцента глюкозооксидазы. - Прикл. биохим. и микробиол. 2007. Т. 43, № 2. С. 207-211.

2.Р.В.Михайлова, Т.В.Семашко, А.Г.Лобанок // Отбор штаммов *Penicillium funiculosum* – высокоактивных продуцентов глюкозооксидазы – Прикл. биохим. и микробиол. 2002. Т. 38, № 3. С.273-277.

APPLICATION OF ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY TO OBTAIN PURIFIED GLUCOSE OXIDASES FROM FUNGI OF PENICILLIUM GENUS

Semashko T.V., Mikhailova R.V., Demeshko O.D.

Institute of Microbiology of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: enzyme@mbio.bas-net.by

Glucose oxidase (EC 1.1.3.4) is one of practically significant enzyme catalasing reaction of glucose oxidation resulting in hydrogen peroxide and D-1,5-gluconolactone.

Glucose oxidase (GOX) is used to determine glucose concentration in biological fluids for medical diagnostic. Glucose analyzers are also applied to detect glucose levels in foodstuffs and to monitor fermentation processes. In chemical industry this enzyme is essential to manufacture gluconic acid, its salts and hydroquinone, in food industry GOX finds wide use as a conservating agent.

Earlier strains – producers of extracellular GOX - *Penicillium adametzii* и *P. funiculosum* were isolated at laboratory of enzymes. Now technologies are elaborated to produce glucose oxidases of different purity grade from afore-mentioned fungi.

Aim of this investigation is to evaluate application potential to sorbents DEAE-Sepharose^{tm} Fast Flow (USA), DEAE- и Q-ceramic (Germany) to derive purified preparations of glucose-oxidasing enzyme by ion exchange chromatography.

We used in the experiments:

1) cultural filtrates: *P. adametzii* (GOX activity – 8,7-9,1 U/ml, specific activity – 89-90 U/mg protein, reducing substances (RS) – 10 mg/ml) and *P. funiculosum* (GOX activity – 16-17,08 U/ml, specific activity – 85-88 U/mg protein, RS – 30 mg/ml);

2) concentrates obtained by ultrafiltration of fungal cultural filtrates on membranes with minimal mass retention limit 10 kDa (*P. adametzii:* GOX activity – 1115,7 U/ml, specific activity – 80 U/mg protein, RS –0 mg/ml, and *P. funiculosum*: GOX activity – 1209,9 ед/мл, specific activity – 76 U/mg protein, RS– 0 mg/ml).

Protein (60-70 mg) was applied on columns filled with sorbents (1×10 cm) and elution was carried out with 0.01 M potassium-phosphate buffer (pH 6,0) using linear NaCl salt gradient (0,0-0,5 M).

It was found that in the course of fungal cultural filtrate flow through the column the enzyme did not bind to the sorbents. Perhaps, it was caused by glucose presence in the filtrates and consequent blocking of electrostatic interaction between enzyme and sorbents.

RS free concentrate of glucose oxidase was used for further studies. Electrophoretic analysis of concentrated GOX preparations obtained by ultrafiltration technique demonstrated presence in test samples, in addition to dominant GOX zone, of minor bands (10-15 in number) matching accompanying proteins.

It was found that the enzyme was firmly bound to sorbents and was readily desorbed in NaCl gradient. A considerable amount of ballast proteins was eluted in the initial fractions (~0,02-0,05 M NaCl), while GOX were mainly eluted in the following fractions ~0,07-0,2 M NaCl).

GOX of *P. adametzii* demonstrated one peak (sorbent – DEAE-Sepharose^{tm} Fast Flow) or 3 peaks (sorbents – DEAE- и Q-ceramic). Specific activity for all fractions ranged from 21,5-153,6 U/mg protein. The best result was recorded with DEAE-ceramic as the sorbent. Specific activity of the enzyme desorbed at 0,1-0,12 M NaCl (3-d peak) constituted 148,9-153,6 U/mg protein, and the enzyme was purified by 1.9 times. Electrophoretic analysis of *P. adametzii* GOX showing maximum specific activity value detected 3 minor bands of by–proteins besides prevalent GOX band.

Chromatography of *P. funiculosum*, using DEAE-Sepharose^{tm} Fast and Q-ceramic sorbents, indicated 3 enzyme-containing peaks, while DEAE-ceramic technique registered 4 peaks. Specific activity of the enzyme fractions ranged from 29,8 to 253,9 U/mg protein. The optical sorbent ensuring yield of *P. funiculosum* GOX preparation with maximal specific activity is DEAE-ceramic. According to electrophoretic analysis, GOX eluted at ~ 0,09-0,13 M NaCl (1-3 peaks) included 2-3 minor bands of ballast proteins, in contract to the enzyme (fourth peak) eluted in subsequent fraction (~0,15-0,17 M NaCl) and characterized by homogeneity. Purification degree of GOX preparation with specific activity 248,9-253,9 U/mg protein was 3.3-fold.

Summing up, conducted experiments allowed to choose efficient sorbent - DEAE-ceramic to produce purified GOX of Penicillium fungi showing high specific activity 148,9- 253,9 U/mg protein and comprising minimal amount of ballast proteins.

This study was financially supported by Basic Research Foundation of Belarus Republic (project B11LIT-012).

References:

1. *R.V. Mikhailova, L.A. Zhukovskaya, A.G. Lobanok* // Spontaneous variability of glucose oxidase-producing fungus *Penicillium adametzii* LF F-2044. - Applied Biochemistry and Microbiology. 2007. Vol. 43, No. 2. P. 207-210.
2. *R.V. Mikhailova, T.V. Semashko, A.G. Lobanok* // Selection of Penicillium funiculosum strains with high glucose oxidase activity. - Applied Biochemistry and Microbiology. 2002. Vol. 38, No. 3. P. 236-239.

ІНТРОДУКОВАНІ ЛІКАРСЬКІ РОСЛИНИ ЯК ДЖЕРЕЛА БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Сидоренко О.В.

ННЦ «Інститут біології» Ботанічний сад імені академіка О.В.Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail: lesha_@bigmir.net

В тропіках і субтропіках зосереджена переважна більшість видів рослинного світу, майже ¾ всіх представників світової флори. Більшість тропічних і субтропічних рослин ще не піддавалися вивченню, хоча багато з них мають корисні властивості й у майбутньому можуть стати одним із основних джерел задоволення дедалі зростаючих потреб людини в рослинній сировині та продуктах харчування. Завдання ботанічних колекцій – це подальші пошуки і мобілізація нових корисних і перспективних рослин з метою збагачення рослинних ресурсів країни. Масове розмноження значимих для людини видів, доступність вихідного садивного матеріалу значною мірою сприяє їх недоторканості в природі. В Ботанічному саду імені академіка О.В.Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка значна увага приділена інтродукції лікарських тропічних рослин. В експозиції оранжереї тропічних рослин представлено більше 400 видів рослин які за своїми корисними властивостями можна виділити в групи - лікарські, плодові, технічні, декоративні. Досвід культивування досліджуваних видів лікарських рослин дає можливість оцінити важливі характеристики в культурі, як здатність до насінневого і вегетативного розмноження. Переважна більшість досліджуваних інтродуцентів досягла флоральної стадії і дала життєздатне насіння. В колекції представлено більше 120 видів лікарських рослин [1]. Рослини цієї групи відносяться до 20 родин і мають різні життєві форми, серед яких домінують багаторічні дерева і кущі. Серед них види, що містять алкалоїди: Rauwolfia serpentina (L.) Benth, Rauwolfia canescens L., Rauwolfia tetraphylla L., Rauwolfia verticillata Baill., Catarantus roseus (L.) G. Don., Dichroa febrifuga Lour., Erythroxylon novogranatense (Murris) Hieron., Coffea arabica L., Coffea canephora Pierre. В колекції представлена група рослин що містять серцеві глікозиди – Acocanthera oppositifolia (Lat.) Codd., Cerbera manghas L., Thevetia peruviana (Pers.) Schev, гіркі глікозиди – Quassia amara L., Kigelia africana Benth. Вуглеводи містять – Caryota urens L., Tamarindus indica L., Manihot palmate Muell., Manihot esculenta Grentz., Acacia arabica L., Averrhoa bilimbi L., Colocasia esculenta (L.) Schott, Amorphophallus rivieri Durieu, Xanthosoma violaceum Schott, Musa cavendishii L, Psidium cuneifolium L., Vangueria madagascariensis J. F. Gmeb. Тригліцериди високомолекулярних жирних кислот містять Ceiba pentandra (L.) Gaertn., Pachira affinis (Mart.) Bakh., Adansonia digitata L.

Основну групу речовин, що входять до складу ефірних олій більшості рослин складають терпени. Рослини що містять ці сполуки - Amommum compactum Solong ex Maton., Plumeria acuminata Ait, Cinnamomum zeylanicum Garc. ex Blume, Hedychium coccineum Buch., Pelargonium madagackariense Barer, Murraya exotica L., Jasminum sambac L.-Ham. Дубильні речовини містяться в Acacia catechu Willd., Leucaena glauca (L.) Benth., Flacourtia cataphracta Roxb., Oncoba spinosa Forssk; сапоніни – Sapindus saponaria L. Смоли і гуми отримують з - Ficus bengalensis L., Copaifera officinalis L., Guajacum sanctum L. Ферменти-специфічні білки що відіграють роль каталізаторів які змінюють характер і швидкість хімічних процесів які відбуваються в організмі. Латекс Carica papaya L., що виділяються з надрізів на зелених плодах, містить фермент папаін який діє аналогічно пепсину. Достиглі плоди містять 10 % цукрів, значну кількість вітамінів. В корені знаходяться речовини, що тонізують нервову систему. Насіння містить жирну олію до складу якої входять олеїнова, пальмитинова, стеаринова і арахідонова кислоти.

Досвід культивування названих вище видів нараховує більше 20 років, що дає можливість підвести попередні підсумки інтродукції і оцінити такі важливі характеристики як здатність до насіннєвого і вегетативного розмноження. Колекційні фонди ботанічного саду є збереженням рослинного генофонду із різних кліматичних зон. Розмноженням і дослідженням рослин у штучних фітоценозах дає змогу не лише створити страхові фонди на майбутнє та для сьогочасного використання з метою відновлення тих чи інших складових рослинного світу, а й значно поглибити знання про особливості їх росту, розвитку, амплітуду вимог до умов екотопу, вміст біологічно-активних речовин. Масове розмноження значимих для людини видів, доступність вихідного садивного матеріалу чи вже готової продукції значною мірою сприяє їх недоторканості в природі.

Литература:

1. Муравьева Д.А Тропические и субтропические лекарственные растения.-М.:Медицина, 1983.-334с.

SPECIES INTRODUCED AS A SOURCE OF MEDICINAL PLANTS BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Sydorenko O.V.

SEC "Institute of biology" Fomin botanical garden, Kyiv National Taras Shevchenko University, Kyiv, Ukraine
e-mail: lesha_@bigmir.net

In the tropics and subtropics greater part of species of vegetation, almost ¾ of all the representatives of the world's flora. Most tropical and subtropical plants have not been subjected to study, although many of them have useful properties in the future can become a source of satisfaction with the growing needs of individuals in plant raw materials and foodstuffs. Tasks botanical collections - it's searching and generating new and useful perspective to enrichment plants resources of the country. Mass propagation of important species for humans, the availability of the original plant material contributes significantly to their security in nature. In Fomin botanical garden Kyiv National Taras Shevchenko University, considerable attention is paid to the introduction of tropical medicinal plants. The exhibition greenhouses of tropical plants presented more than 400 species of plants in their useful properties can be identified in the group - medicinal, fruit, engineering, fine. Experience in cultivation of medicinal plants studied species provides an estimate important characteristics in culture, as the ability to seed and vegetative propagation.

The vast majority of introduced plants has studied the floral stage and gave viable seeds. The collection presents more than 120 species of medicinal plants. Plants of this group includes 20 families and have different life forms, including the dominant perennial trees and shrubs. Among these species, which contain alkaloids: Rauwolfia serpentina (L.) Benth, Rauwolfia canescens L., Rauwolfia tetraphylla L., Rauwolfia verticillata Baill., Catarantus roseus (L.) G. Don., Dichroa febrifuga Lour., Erythroxylon novogranatense (Murris) Hieron., Coffea arabica L., Coffea canephora Pierre. The collection represented a group of plants containing cardiac glycosides - Acocanthera oppositifolia (Lat.) Codd., Cerbera manghas L., Thevetia peruviana (Pers.) Schev, bitter glycosides - Quassia amara L., Kigelia africana Benth. Carbohydrates contain - Caryota urens L., Tamarindus indica L., Manihot palmate Muell., Manihot esculenta Grentz., Acacia arabica L., Averrhoa bilimbi L., Colocasia esculenta (L.) Schott, Amorphophallus rivieri Durieu, Xanthosoma violaceum Schott, Musa cavendishii L, Psidium cuneifolium L., Vangueria madagascariensis J. F. Gmeb. Triglycerides are fatty acids containing high Ceiba pentandra (L.) Gaertn., Pachira affinis (Mart.) Bakh., Adansonia digitata L.

The main group of substances that are part of essential oils of most plants form terpenes. Plants containing these compounds - Amommum compactum Solong ex Maton., Plumeria acuminata Ait, Cinnamomum zeylanicum Garc. ex Blume, Hedychium coccineum Buch., Pelargonium madagackariense Barer, Murraya exotica L., Jasminum sambac L.-Ham. Tannins found in Acacia catechu Willd., Leucaena glauca (L.) Benth., Flacourtia cataphracta Roxb., Oncoba spinosa Forssk; saponins - Sapindus saponaria L. Resin and rubber derived from - Ficus bengalensis L., Copaifera officinalis L., Guajacum sanctum L. Enzymes-proteins that act as catalysts that change the nature and speed of chemical processes that occur in the body. Latex Carica papaya L., which allocated with cuts on green fruit contains the enzyme papain which is similar to pepsin. Ripe fruits contain 10% sugars, significant amounts of vitamins. The root are substances that tone up the nervous system. Seeds contain fatty oil consisting of oleic acid.

Experience of the above types of cultivation has more than 20 years, allowing to sum up preliminary results and evaluate the introduction of such important characteristics as the ability to seed and vegetative propagation. Collection funds botanical garden is a plant genetic conservation of the different climatic zones. Reproduction and research in artificial plants phytocenoses allows not only to create insurance funds for the future and for momentary use of the rehabilitation of various components of vegetation, but also greatly enhance knowledge about the peculiarities of their growth, development, range requirements for habitats, the content of biologically active substances. Mass propagation of important species for humans, the availability of the original plant material or finished products contributes significantly to their security in nature.

References:

1. Muravieva D.A Tropical and subtropical medicinal plants .- M.: Medicine, 1983.-334s.

НОВЫЙ ПОДХОД К ПРОБЛЕМЕ КАЧЕСТВА ХЛЕБА

[1]Симак В., [1]Шандрик М.М., [2]Каражия В., [2] Николаева Д.,[3] Головко Ю.

[1] Национальный Институт Исследований и Развития для Пищевых Биоресурсов - ИБА Бухарест, Бухарест, Румыния, e-mail: simacv@yahoo.com, viorel.simac@bioresurse.ro
[2] Научно-практический институт садоводства, виноградарства и пищевых технологий, Кишинев, Молдова, e-mail: ltpa_caragia@mail.ru
[3] "SVD –GRUP" SRL, Кишинев, Молдова, e-mail: info@ecoextract.com

Хлеб и другие хлебобулочные изделия являются наиболее важными продуктами питания, потребляемыми ежедневно на мировой сфере. Классический подход к качеству хлеба был сосредоточен на пористость и белизну мякиша хлеба. Он настолько распространился, что даже в наши дни, когда наука питания обнаружила значение некоторых биологически активных веществ, которые здесь отсутствуют, большинство потребителей и производителей, ищут или производят этот тип хлеба. Является ли это хорошей практикой производства продуктов питания и поведение потребителей или нет?

Если бы хлеб и хлебобулочные изделия представляли собой небольшую часть нашего ежедневного потребления, может быть ситуация не была бы плохой. Но в большинстве случаев, хлеб и хлебобулочные изделия приносят около 20-30% калорий ежедневного потребления. В соответствии с классическим подходом к качеству хлеба, для "лучшей" пористости и белизны мякиша производителю будет необходимо мука с низкой экстракцией и насколько возможно белее, помимо качества и количества клейковины, содержание α-амилазы и т.д. С этой же целью необходимо будет добавить некоторые улучшители. Как результат, конечный продукт выглядит "хорошо", но его питательная ценность беднейшие возможно и даже может быть вредным.

Это является подходящим объяснением некоторых выявленных связей между потреблением белого хлеба и раком почек и колоректальным раком. Различные исследования, проведенные в различных странах (Великобритания, Италия и Польша) пришли к одним и тем же выводам. Данные настолько ясные, что для хлеба который не причиняет вреда, установлена даже новая характеристика: "не-белый", то есть любой хлеб (цельнозерновой, чёрный, ржаной, мульти-зерновой, с семенами, и т.д.), с исключением белого хлеба, который теперь квалифицируется как "плохой". В то время как научные доказательства очевидные, все еще остается расстояние между наукой и производством, между наукой и потребительскими предпочтениями. Причина этого расстояния простое: производители ищут деньги и, следовательно, продают все что продается, в данном случае - белые хлебобулочные изделия. С другой стороны, потребители обычно покупают продукты, которые широко распространены, потому что они дают впечатление надежности. Таким образом, находимся в порочном кругу, по-видимому без выхода.

Решения этой ситуации входит в ответственность ученого и научных коммуникаций. Это люди, которые знают, и которые владеют лучшими средствами для распространения этих знаний в широких масштабах для производителей, потребителей и других ученых. Лучший способ избежать рака, это предотвратить его. Пусть наша пища будет нашим лекарством, как сказал Гипократ.

На пути к новому и здоровому хлебу, полезно принять во внимание не только пищевые волокна, которые, между прочим, очень важны, но также питательную и сенсорную характеристику, срок годности, отсутствие микотоксинов, химических поллютантов или вредителей, тип ингредиентов (натуральные, желательно органические и не-ГМО) и использование последних имеющихся систем безопасности пищевых продуктов и стандартов, как ISO 22000, HACCP и Надлежащей производственной практики.

Кроме пшеничной и ржаной муки (даже цельнозерновой), сенсорные и питательные характеристики могут быть улучшены с помощью различного вида ингредиентов, которые обычно не используются в приготовлении хлеба: травы и приправы, фрукты, семена, овощи, бобовые плоды и зерновые культуры. Эти материалы могут быть использованы в различных формах: нарезанные, сушеные, порошок, молотые, мука, хлопья и масло. Потенциальные поставщики ингредиентов в этом случае могут быть: производители пищевых добавок и природных лекарств, которые обычно имеют натуральные побочные продукты, пищевые компании с натуральными продуктами или побочными продуктоми, фермеры.

Пример использования новых ингредиентов в хлебобулочных продуктов является объединение с технологий сверхкритической экстракции с CO_2. Эта технология извлекает из натурального сырья, при низкой температуре, различные фракции богатые в биологически активных веществах. Как правило, эти фракции могут быть использованы в фармацевтической, косметической промышленности или промышленности пищевых добавок. Но будут получаться также некоторые побочные продукты, которые могут быть очень хорошо использованы в хлебобулочной технологии.

Литература:

1. *M. A. Sanjoaquin, P. N. Appleby, M. Thorogood, J. I. Mann and T. J. Key,* "Nutrition, lifestyle and colorectal cancer incidence: a prospective investigation of 10.998 vegetarians and non-vegetarians in the United Kingdom", British Journal of Cancer (2004) 90, p.118–121, doi: 10.1038/sj.bjc.6601441.
2. *E. Bidoli, S. Franceschi, R. Talamini, S. Barra, C. L. Vecchia*, "Food consumption and cancer of the colon and rectum in north-eastern Italy", International Journal of Cancer, Vol. 50, Issue 2, p. 223–229, 21 January 1992.
3. *H. Boeing, W*. Jedrychowski, J. Wahrendorf, T. Popiela, B. Tobiasz-Adamczyk and A. Kulig, "Dietary risk factors in intestinal and diffuse types of stomach cancer: a multicenter case-control study in Poland", Cancer Causes and Control, Volume 2, Number 4, p.227-233, doi: 10.1007/BF00052138.

A NEW APPROACH ON BREAD QUALITY

[1]Simac V., [1]Sandric M.M., [2]Caragia V., [2] Nicolaeva D., [3]Golovco Ju.

[1] National Institute of Research & Development for Food Bioresources - IBA Bucharest, Bucharest, Romania, e-mail: simacv@yahoo.com, viorel.simac@bioresurse.ro
[2] Scientific-Practical Institute of Horticulture, Viticulture and Food Technology, Laboratory of Food Technology, Chisinau, Moldova, e-mail: ltpa_caragia@mail.ru
[3] "SVD-GROUP" SRL, Chisinau, Moldova, e-mail: info@ecoextract.com

Bread and other bakery products are the most important consumed worldwide daily food products. The classical bread quality approach has been focused on the bread crumb porosity and whiteness. It has so much spread over the world that, even in our days, when nutrition science have discovered the importance of some biologically active compounds, which are missing here, most of the consumers and of the producers are looking for or producing a such type of bread. It's normally and good consumer behavior and food production practice or not?

If the bread and bakery products would be representing a little slice of our daily intake, may be the situation would not be so bad. But in most of the cases, bread and bakery products bring about 20-30% of our daily calories. According to classical bread quality approach, to achieve the "best" crumb porosity and whiteness the producer will need the flour with lower extraction rate, the whitest as possible, besides the quality and quantity of gluten, the content of α-amylases, etc. For the same purpose it will be necessary to add some additives. As a result, the final product looks "good", but its nutritional value is the poorest possible and even may be harmful.

This is the correct explanation for some of the identified connections between white bread consumption and kidney and colorectal cancer. Different studies conducted in different countries (UK, Italy and Poland) came to the same conclusions. The fact is so clear, that for non-harmful bread even has been established a new characteristic: "non-white", meaning any kind of bread (whole meal, brown, rye, multi-cereal, with seeds, etc), except white bread, which is now qualified as bad. While the scientific proves is evident, still remain a gap between science and production, between science and consumption preferences. The explanation of that gap is simple: the producers are looking for money and consequently sell everything can be sold, in this case – white bakery products. On the other hand, the consumers usually are buying the products which are widely sold, because it gives an impression of safety. So, it's a vicious circle, with apparently no exit.

To solve this situation is the role of the scientist and of the scientific dissemination. They are the people who know and who own the best means to spread this knowledge at large scale for producers, consumers and other scientists. The best way to escape cancer is to prevent it. Let than our food be our medicines, as Hypocrites has said.

On the way to new and healthy bread, it's useful to take into account not only the fiber intake, which is very important, by the way, but also the nutritional and sensorial characteristics, the shelf life, the absence of mycotoxins, chemical pollutants or pests, the type of the ingredients (natural, organic preferably and non-GMO) and utilization of latest available food safety systems and standards, like ISO 22000, HACCP and Good Manufacturing Practices.

Besides the wheat and rye flour (even whole meal), the sensorial and nutritional characteristics may be improved by using of different kind of ingredients, which are not normally used to make bread: herbs and spices, fruits, seeds, vegetables, legumes and cereals. These materials may be used in different forms: grounded, dried, powder, meals, flour, flakes and oil. Potential ingredients suppliers in this case may be the following: producers of food supplements and natural medicines, which usually have natural by-products, food companies with natural products or by-products, farmers.

An example of new ingredients to be used in bakery is by a merging with the supercritical CO_2-extraction technology. That technology extracts from natural raw materials, at low temperature, different fraction rich in biologically active substances. Normally, these fractions may be used in pharmaceutical, cosmetics or food supplements industry. But there will be some by-products, which may be very well used in bakery technology.

References:

1. *M. A. Sanjoaquin, P. N. Appleby, M. Thorogood, J. I. Mann and T. J. Key,* "Nutrition, lifestyle and colorectal cancer incidence: a prospective investigation of 10.998 vegetarians and non-vegetarians in the United Kingdom", British Journal of Cancer (2004) 90, p.118–121, doi: 10.1038/sj.bjc.6601441.
2. *E. Bidoli, S. Franceschi, R. Talamini, S. Barra, C. L. Vecchia,* "Food consumption and cancer of the colon and rectum in north-eastern Italy", International Journal of Cancer, Vol. 50, Issue 2, p. 223–229, 21 January 1992.
3. *H. Boeing, W. Jedrychowski, J. Wahrendorf, T. Popiela, B. Tobiasz-Adamczyk and A. Kulig,* "Dietary risk factors in intestinal and diffuse types of stomach cancer: a multicenter case-control study in Poland", Cancer Causes and Control, Volume 2, Number 4, p.227-233, doi: 10.1007/BF00052138.

ВПЛИВ УМОВ МІНЕРАЛЬНОГО ЖИВЛЕННЯ НА НАКОПИЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДУ РУТИНУ В ЛИСТКАХ ТА СУЦВІТТЯХ *FAGOPYRUM ESCULENTUM* L.

Смірнов О.Є., Косик О.І.

Навчально-науковий центр „Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail: mcd_smirnov@mail.ru

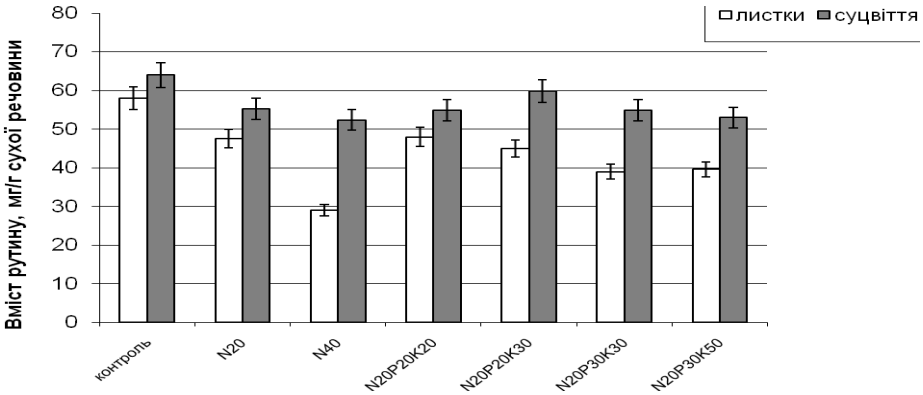
Розробка новітніх технологій отримання різних біологічно активних речовин є особливо актуальною у зв'язку з інтенсифікацією сільскогогосподарського виробництва. Водночас, створення сучасних біологічних препаратів неможливе без глибоко знання біохімічних та фізіологічних процесів.

Встановлено, що основними біологічно активними речовинами рослинного походження є фенольні сполуки класу флавоноїдів. Характерною ознакою яких є висока фізіологічна активність широкого спектру дії: ніпоазотермічної, противиразкової, вітамінної, атиоксидантної, стабілізуючої, захисної від ультрафіолетового опромінення, антипухлинної, барвникової, дубильної, що обумовлює значну зацікавленість біохіміків рослин і тварин, фітопатологів, хіміків, генетиків та біотехнологів.

Нами виявлено, що вегетативна маса гречки, яка є відходом від її переробки на зерно, є потенційним джерелом біологічно активних речовин. У надземних органах гречки знайдено рутин, кверцетин, гіперозид та кверцетрин. Рутин (вітамін Р), отриманий з рослин роду *Fagopyrum*, є основою багатьох лікарських засобів. Широкий спектр дії рутину робить його цінною біологічно активною речовиною і потребує вирішення питання дешевого та легкого способу його отримання з рослинної сировини.

В умовах польового досліду нами було досліджено вплив різних доз мінеральних добрив на накопичення біологічно активних речовин в листках та суцвіттях гречки посівної сорту Лілея (*Fagopyrum esculentum* L.). З урахуванням агрохімічних характеристик грунту на дослідних ділянках здійснювали регулювання елементного складу мінеральних добрив за наступними варіантами: контроль, N_{20}, N_{40}, $N_{20}P_{20}K_{20}$, $N_{20}P_{20}K_{30}$, $N_{20}P_{30}K_{30}$, $N_{20}P_{30}K_{50}$. Дозові концентрації азоту, фосфору та калію визначали на основі стандартних рекомендацій щодо підживлення рослин, а також моделювали різні комбінації дозового співвідношення елементів.

При проведенні досліджень по вивченню впливу умов вирощування гречки і, зокрема, мінерального живлення встановлено, що в усіх варіантах з внесенням під рослини додаткових кількостей азоту, фосфору та калію спостерігалося зменшення вмісту рутину у листках і суцвіттях. Причому, азотні добрива викликали найбільші зміни кількісних показників. Високі дози азотних добрив призводили до максимального зменшення вмісту біологічно активної речовини – флавоноїду рутину в органах гречки:



Отримана залежність є важливим елементом для розробки технічної документації по вирощуванню гречки як джерела біологічно активних сполук. Крім того, виявлені закономірності важливі в плані отримання екологічно збалансованої сільскогосподарської продукції та раціонального використання мінеральних добрив.

Отже, встановлено, що високі дози азотних добрив призводять до максиамльного зменшення концентрації біологічно активних речовин в органах гречки. Цей показник демонструє перспективність використання гречки на малородючих ґрунтах з мінімальним використанням мінеральних (азотних) добрив.

EFFECT OF MINERAL NUTRITION ON THE RUTIN ACCUMULATION IN LEAVES AND INFLORESCENCES OF *FAGOPYRUM ESCULENTUM* L.

Smirnov O., Kosyk O.

Educational and Scientific Centre "Institute of Biology" of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine
e-mail: mcd_smirnov@mail.ru

Development of new technologies of various biologically active substances is particularly important in the intensification of agricultural production. However, the creation of modern biological products is impossible without deep knowledge of biochemical and physiological processes.

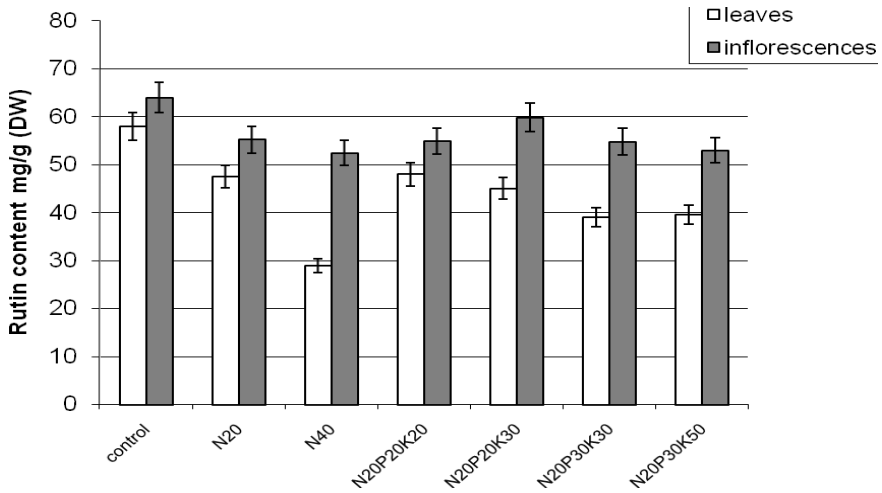
Was reveal that the main of plant biologically active substances are phenolic compounds (flavonoids). They are characterized by physiological activity of a wide action spectrum: antiulcer, vitamin, antioxidant, stabilizing, ultraviolet radiation protecting, antitumor, tannic, that raise interest among plant and animal biochemists, plant pathologists, geneticists and biotechnologists.

We found that the vegetative mass of buckwheat, which is a departure from its processing of grain, is a potential source of biologically active substances. Flavonoids – rutin and quercetin were found in the above-ground organs of buckwheat. Rutin (vitamin P) obtained from the genus *Fagopyrum*, is the source for drugs. A wide range of rutin makes it valuable biologically active substance and requires the issue of cheap and easy way of it obtain from plant material.

In a field experiment we have investigated the effects of various doses of fertilizers on the bioactive substances accumulation in the leaves and inflorescences of buckwheat crop variety Lileya (*Fagopyrum esculentum* L.). We performed control element composition of fertilizers in the following variants: control, N_{20}, N_{40}, $N_{20}P_{20}K_{20}$, $N_{20}P_{20}K_{30}$, $N_{20}P_{30}K_{30}$, $N_{20}P_{30}K_{50}$.

Dose of nitrogen, phosphorus and potassium were determined by based on standard recommendations for fertilizing plants and also were simulated different dose ratio combinations of elements.

By researching the impact of buckwheat growing conditions, including mineral nutrition, we found that in all versions with nitrogen, phosphorus and potassium fertilization decreased content of rutin in leaves and inflorescence. At the same time, highest doses of nitrogen fertilizer resulted in a maximum reduction of biologically active substance - flavonoid rutin in buckwheat:



The dependence is an important element for developing technical documentation for growing buckwheat as a source of biologically active compounds. In addition, the regularities are important in terms of ecologically balanced agricultural production and rational use of mineral fertilizers.

Therefore, it is found that highest doses of nitrogen fertilizers lead to reduce the concentration of biologically active substance (rutin). This index demonstrates the prospects of using buckwheat in marginal soils with minimal use of fertilizer rate.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ЭКСТРАКЦИИ ПРЯНОАРОМАТИЧЕСКИХ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ФЛАВОНОИДОВ И ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ

Спиридович Е.В., Шутова А.Г., Сергеенко Н.В.

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь
e-mail: anna_shutova@mail.ru

Растения семейства *Lamiaceae* могут быть использованы в качестве источника флавоноидов и гидроксикоричных кислот, однако на их содержание в конечном продукте существенное значение будет оказывать способ экстракции растительного сырья. Поэтому задачей нашей работы было изучение состава и количества биологически активных веществ фенольной природы, флавоноидов и гидроксикоричных кислот, в экстрактах из пряноароматического и лекарственного сырья семейства *Lamiaceae* при использовании двухстадийной схемы экстракции водноспиртовыми смесями различной концентрации.

Содержание экстрактивных веществ, флавоноидов и гидроксикоричных кислот в растительном сырье семейства *Lamiaceae* и в экстрактах из него, полученных при двухкратном настаивании водноспиртовыми смесями с различной концентрацией этанола на первой и второй стадиях экстракции (50%+18%; 18%+18%; 50%+50%), определяли по методикам [1,2].

Наибольшим количеством экстрактивных веществ отличалось растительное сырье мяты перечной, шалфея лекарственного, тимьяна ползучего, душицы обыкновенной, мяты лимонной и базилика благородного (более 25%) , а наименьшим – чабера горного (7,5±0,4%).

Среди 11 изученных растений наименьшее количество (менее 6 мг/г) флавоноидов обнаружено в базилике благородном, чабере горном и шалфее мускатном. Мелисса лекарственная также не содержала больших количеств флавоноидов, однако количество гидроксикоричных кислот в данном растительном сырье находилось на высоком уровне. Повышенной концентрацией гидроксикоричных кислот отличался тимьян ползучий (30,2±0,6 мг/г). Среди изученных представителей рода *Mentha* мята перечная содержала гидроксикоричные кислоты в значительно большем количестве (37,9±0,8 мг/г), чем мята лимонная (20,5±0,7 мг/г). Напротив, мята лимонная характеризовалась более высоким содержанием флавоноидов.

При двухкратной экстракции сырья пряно-ароматических растений семейства *Lamiaceae* водноспиртовыми смесями по схеме 50%+18% в раствор переносится наибольшее количество экстрактивных веществ (0,9–2,9 г/100 мл). В то же время для экстракции по схемам 18%+18% и 50%+50% эти показатели составляли 0,5–1,3 г/100 мл и 0,3–1,3 г/100 мл, соответственно. Лишь в случае экстракции растительного сырья чабера горного имело место повышение содержания экстрактивных веществ в экстракте при повышении объемной доли этанола в экстрагенте. Преимущество двойной экстракции по схеме 50%+18% было наиболее существенным в случае мяты лимонной (в 4,6 и 3,6 раза больше экстрактивных веществ в сравнении с экстракцией по схемам 18%+18% и 50%+50%, соответственно), мелиссы лекарственной (в 2,1 и 6,0 раз эффективнее), тимьяна ползучего (в 2,1 и 7,5 раз эффективнее).

Анализируя результаты, полученные при экстракции растительного сырья семейства *Lamiaceae* тремя различными способами с использованием водноспиртовых смесей с разной концентрацией, можно сделать следующие заключения:

– наибольшее количество экстрактивных веществ характерно для экстрактов, полученных экстракцией водноспиртовыми смесями по схеме 50%+18%;

– экстракция по схеме 18%+18% приводит к неудовлетворительному извлечению флавоноидов из растительного сырья семейства *Lamiaceae*;

– для мяты перечной, мяты лимонной, чабера горного, душицы обыкновенной, многоколосника морщинистого, монарды дудчатой, мелиссы лекарственной и тимьяна ползучего двухстадийная экстракция по схеме 50%+18% была наиболее эффективной для извлечения флавоноидов;

– наиболее эффективная экстракция флавоноидов по схеме 50%+50% достигалась для шалфея лекарственного (на 57% более эффективна в сравнении со схемой 50%+18%) и шалфея мускатного (на 40% более эффективна);

– для всех изученных видов растительного сырья вариант экстракции по схеме 50%+18% показал наилучшие результаты по извлечению гидроксикоричных кислот;

– экстракция гидроксикоричных кислот водноспиртовой смесью по схеме 50%+50% была более эффективной, чем экстракция 18% водноспиртовой смесью (за исключением базилика благородного);

– экстракция гидроксикоричных кислот из растительного сырья мелиссы лекарственной была одинаково эффективной в случае схем 50%+50% и 18%+18% (не выявлено достоверных различий при $p < 0,05$).

Литература:

1. *В.М. Косман, И.Г. Зенкевич* // Количественное экстракционно–спектрофотометрическое определение суммарного содержания гидроксикоричных кислот в присутствии флавоноидов в экстрактивных веществах некоторых лекарственных растений - Растительные ресурсы, 2001,Т. 37, вып. 4. с. 123–129.
2. Государственная Фармакопея РБ: Общие методы контроля качества лекарственных средств / Центр экспертизы и испытаний в здравохранении; под общ. ред. Годовальникова Г.В. – Минск: Минский государственный ПТК полиграфии, 2006. – 650 с.

COMPARATIVE ESTIMATION OF VARIOUS WAYS EXTRACTION EFFICIENCY FROM SPICE AND HERBS WITH HIGH VALUE OF FLAVONOIDS AND HYDROXYCINNAMIC ACIDS

Spiridovich A., Shutava H., Sergeenko N.

Central Botanical Garden of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: anna_shutova@mail.ru

Lamiaceae plants can be used as a source of flavonoids and hydroxycinnamic acids, however on their content in an end-products essential value will influence a way of extraction. Therefore purpose of our work was studying of biologically active substances quantity of the phenolic nature, flavonoids and hydroxycinnamic acids, in extracts from *Lamiaceae* spice and herbs with different ethanol concentration water-alcohol mixtures.

The content of extractive substances, flavonoids and hydroxycinnamic acids in vegetative raw materials of family *Lamiaceae* and in their extracts, received by water-alcohol mixtures with different ethanol concentration on the first and second stage (50 % + 18 %; 18 % + 18 %; 50 % + 50 %) [1,2].

The vegetative raw materials of peppermint, sage, thyme, oregano, bergamot mint and basil were remarkable for the greatest quantity of extractive substances (more than 25 %), and the least – winter savory (7,5±0,4%).

Among 11 studied plants the least quantity (less than 6 mg/g) flavonoids are revealed in a basil, winter savory and a clary sage. *Melissa officinalis* didn't contain considerable quantities of flavonoids, however the quantity of hydroxycinnamic acids was at high level.

Thyme was remarkable for the greatest quantity of hydroxycinnamic acids (30,2±0,6 mg/g). Among the studied representatives of *Mentha* peppermint contained the greatest quantity of hydroxycinnamic acids (37,9±0,8 mg/g) unlike bergamot mint (20,5±0,7 mg/g). On the contrary, bergamot mint was characterized by higher flavonoids content.

The greatest quantity of extractive substances (0,9–2,9 g/100 ml) was transferred to a extract at two-stage extraction under the scheme 50 % + 18 %. At the same time for schemes 18 % + 18 % and 50 % + 50 % these value were 0,5–1,3 g/100 ml and 0,3–1,3 g/100 ml, accordingly.

An increase of extractive substances content in extracts in accordance with increase of ethanol concentration in extragent was observed only in a case of winter savory extraction.

Advantage double extraction under the scheme 50 % + 18 % was the most essential in case of *Mentha piperita var.citrata* (in 4,6 and 3,6 times more extractive substances in comparison with extraction under schemes 18 % + 18 % and 50 % + 50 %, accordingly), *Mellissa officinalis* (in 2,1 and 6,0 times is more effective), *Thymus serpyllum* (in 2,1 and 7,5 times is more effective).

Analyzing the results received at extraction of *Lamiaceae* vegetative raw materials in three various ways with use of different ethanol concentration mixes, it is possible to make following conclusions:

– the greatest quantity of extractive substances is characteristic for the extracts received by the scheme 50 % + of 18 %;

- the extraction under the scheme 18 % + 18 % lead to unsatisfactory flavonoids extraction from vegetative raw materials of *Lamiaceae* family;

– for peppermint, bergamot mint, winter savory, oregano, beebalm, thyme, korean mint extraction under the scheme 50 % + 18 % was the most effective for flavonoids extraction;

– the most effective flavonoids extraction under the scheme 50 % + 50 % was reached for a sage (on 57 % is more effective in comparison with the scheme 50 % + 18 %) and a clary sage (on 40 % is more effective);

– for all studied sorts of vegetative raw materials the extraction under the scheme 50 % + 18 % has shown the best results on hydroxycinnamic acids extraction;

– hydroxycinnamic acids extraction under the scheme 50 % + 50 % was more effective, than 18 % + 18 % (except basil);

– hydroxycinnamic acids extraction from lemon balm was equally effective in case of schemes 50 % + 50 % and 18 % + 18 % (it is not revealed authentic distinctions at $p < 0,05$).

References:

1. *V.M.Kosman, I.G.Zenkevich* // Rastitelnie resursy, 2001, T. 37, № 4. p. 123–129.
2. The Pharmacopoeia RB: the General quality monitoring of quality of medical products – Minsk, 2006. – 650 p.

ВИТАМИННЫЙ ГРИБНОЙ ПРЕПАРАТ: ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ

[1]Супрун С.М., [1]Донченко Г.В., [2]Аретинская Т.Б, [2]Харкевич Е.С., [1]Кучмеровская Т.М.

[1]Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев,Украина
e-mail: sst@biochem.kiev.ua
[2]Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, Украина

Микромицеты являются перспективными для использования в сельском хозяйстве, медицине, рациональном природопользовании [1–3]. Грибы ценный источник природных форм биологически активных веществ, а именно: незаменимых аминокислот, ненасыщенных жирных кислот, витаминов, витаминоподобных веществ, таких как убихинон $Q_{10,}$ и других, обладающих свойствами антиоксидантов и антимутагенов. Они являються источником для получения новых видов биопрепаратов, в которых природные биокомплексы сбалансированы.

Цель наших исследований: разработка биотехнологии получения витаминно-протеинового препарата на основе селекционированных штаммов-продуцентов витаминов и изучение его действия на различные группы животных. Нами были селекционированы штаммы микромицетов, которые обладали способностью продуцировать протеины и витамины: *Mycelia sterilia* IMB F-10014 – продуцент протеина и тиамина; *Fusarium sambucinum* ВКПМ F-139 – кофермента А; *Fusarium sambucinum* ИМВ F-10011 – витамина B_3 (никотиновой кислоты) и ее биологически активных производных, а также других биологически активных веществ: *Penicillium* sclerotiorum F-10015 – β-каротина.

Изучение физиолого-биохимических особенностей, а именно характеристик роста, биосинтеза протеинов, витаминов, а также их антагонистических свойств позволило отобрать культуры для совместного культивирования с целью получения кормовой и пищевой добавки – *Fusarium sambucinum* – продуцент комплекса витаминов и *Mycelia sterilia* – продуцент протеина, содержание лизина и триптофана в котором повышено. Следует отметить, что скорость роста этих культур была относительно высокой 0,25 – 0,35 $ч^{-1}$, что свидетельствует о перспективности их промышленного использовании.

Отработаны условия совместного культивирования исследуемых культур на стендовой установке Научно-технического центра производственной биотехнологии ОАО «Стиролбиотех». Были наработаны партии препарата в производственных условиях с использованием ферментационного аппарата (1,2$м^3$) в ПП БТУ Центр (г. Ладыжин). В результате совместного культивирования в 2-3 раза возрастало содержание исследуемых витаминов в препарате, при этом сокращались сроки ферментации до 40–42 часов. Разработанная технология позволяет получать различные формы грибного препарата (порошкообразную и жидкую). При этом жидкая форма препарата может быть получена при специальной термической обработке. Полученый витаминно-протеиновый препарат представляет собой сбалансированный природный биокомплекс витаминов, коферментов, незаменимых аминокислот, с преобладанием лизина и аланина. Содержание протеина в препарате достигает 45,0- 50,0 %, липидов - 4,4-4,6%, хитина – 7,2-7,8%; витаминов в мкг/г: тиамина (B_1) – 25,0-30,0; пантотеновой кислоты (B_5) – 1250,0-1400,0; никотиновой кислоты (B_3) – 800,0-1200,0; биотина (B_7) – 18,0-20,5; убихинона (Q_{10}) – 28,0-32,0; каротиноидов –97,0-120,0; NAD – 450-600; витамина Е – 38,0-40,0; а также содержит эссенциальные жирные кислоты (линоленовую и арахидоновую кислоты).

Полученный препарат был испытан в опытах на лабораторных мышах, шелкопряде, икре карпа. В экспериментах с мышами установлено, что при введении в корм биопрепарата общее состояние мышей было удовлетворительным, животные потребляли корм и воду как при обычных физиологических условиях. Выживаемость животных в подопытных группах, как и в контроле, составляла 100%. При анализе периферической крови исследуемых животных было обнаружено, что уровень гемоглобина, количество эритроцитов и лейкоцитов у мышей находилось в пределах физиологической нормы. Однако, было выявлено снижение палочкоядерных форм лейкоцитов, что можно расценивать как фактор положительного влияния препарата на организм. В то же время препарат не оказывал действие на уровень тромбоцитов в крови. Интересным моментом работы было то, что при использовании препарата в дозе 1,8 г/особь в мозге животных содержание аммиака снижалось в 2,85 раза.

Нами было показано, что использование препарата при выращивании дубового шелкопряда способствовало значительному повышению жизнеспособности гусениц – на 14,8%; массы кокона и шелковой оболочки на 11,2% и 12,8%, соответственно. То есть, полученный препарат можно применять для защиты полезных насекомых от инвазивных (микроспориоз дубового шелкопряда) и экзогенных инфекций (ядерного полиэдроза). Применение препарата при кормлении шелкопряда на нетрадиционном кормовом растении - грабе обыкновенном позволило сократить сроки выращивания, а также улучшить его биотехнологические показатели. При обработке икры карпа биопрепаратом выход личинок из подопытной икры составил около 100%, тогда как выход в контроле не превышал 74%. Данный биопрепарат повышал, во-первых, процент выхода личинок из икры, снижал их пораженность сапролегниозом; во-вторых, увеличивал стойкость личинок, вышедших из обработанной биопрепаратом икры.

Полученные результаты испытания грибного препарата позволяют прогнозировать возможность его использования в животноводстве, а также для получения лекарственных средств на его основе.

Литература:

1. *M. Wainwright* // Novel use for fungi in biotechnology - Chem. Ind., 1990, N 2., P. 131 – 134.
2. *Ch. Hobbs* // Medicinal mushrooms an exploration of tradition healing and culture - Botanica press. Santa Cruz, C.A., 1995, 251 p.
3. *Е. П. Феофилова., Д. В. Немцев, В. М. Терешина , В. П. Козлов* // Полиаминосахариды мицелиальных грибов: новые биотехнологии и перспективы практического использования - Прикладная биохимия и микробиология, 1996, т. 32, N 5, с. 483 – 492.

VITAMIN PREPARATION FROM FUNGI: OBTAINING AND APPLICATION

[1]Suprun S.M., [1]Donchenko G.V., [2]Aretinskaya T.B., [2]Kharkevich E.S., [1]Kuchmerovskaya T.M.

[1] Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: sst@biochem.kiev.ua
[2] National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Micromycetes are perspective for using in agriculture, medicine and environmental protection [1-3]. Fungi are source of biologically active natural substances, such as essential amino acids, vitamins, vitamin like substances, as ubiquinone Q_{10} and other which possesses antioxidant and antimutagene properties. They are source for obtaining new forms of biopreparations where natural biocomplexces were balanced. New biotechnologies were developed for obtaining lipids, food fibres based and pharmacological preparations using of micromycetes.

The aim of our investigations was development of biotechnology obtaining of vitamin preparation based on fungal selected strains-which are producers of vitamins an studding its action on diferent animals.

We have selected the strains-producers of proteins and vitamins: *Mycelia sterilia* IMB F-10014 – protein and thiamine producer; *Fusarium sambucinum* F-139 - coenzyme A; *Fusarium sambucinum* IMV F-10011 – nicotinic acid and its derivatives and others biologically active substances; *Penicillium sclerotiorum* F-10015 – β-carotene.

Based on studying of physiological and biochemical peculiarities such as growth characteristics, protein and vitamins biosynthesis the cultures for joint cultivation were selected that allowed to choose *Mycelia sterilia* and *Fusarium sambucinum* for obtaining of food and chow additives.

It has been fulfilled conditions of their joint cultivation on a standing installation of the Scientific-Technical Center of Industrial Biotechnology OAS “Stirolbiotech”. According to biotechnology which was developed by BC Center (town Ladygyn) was prepared new samples of preparation. Joint cultivation of strains has allowed increasing by 2-3 times the content of investigated vitamins at the same time the terms of fermentation were reduced to 40-42 hours. Different forms of fungal preparations namely powdered and liquid were obtained due to the developed technology. The liquid form of preparation can be obtained by using special thermal processing. The obtained vitamin preparation contains the complex of natural biologically active substances: the protein 45.0 - 50.0%, lipids - 4,4-4,6%, chitin - 7,2-7,8%; vitamins in mg/g: thiamine (B1) - 25,0 -30.0, pantothenic acid (B5) - 1250,0-1400,0, nicotinic acid (B3) - 800,0-1200,0, biotin (B7) - 18,0-20,5; ubiquinone (Q10) - 28,0-32,0; carotenoids -97,0-120,0; NAD - 450-600; vitamin E - 38,0-40,0; and also contains essential fatty acids (linolenic and arachidonic acid). Obtained preparation has been tested on mice, silkworm and carp spawn. Survival of mice in investigated groups was similar to control.

We analyzed peripheral blood of tested animals and found that hemoglobin level, red blood cells and white blood cells in mice were within the physiological norm. However, it was shown a reduction of band forms of white blood cells that can be considered as a factor in the positive effect of the drug on the organism. At the same time the drug had no effect on the level of platelets in the blood. It was found that using the drug at a dose of 1.8 g per mouse induced decrease of brain ammonia content by 2.85-fold.

Using of the drug for oak silkworm growth contributed substantially to increasing the viability of the caterpillars by 14,8%, the mass of the cocoon and silk shell at 11.2% and 12.8%, respectively. So, the preparation can be used to protection of useful insects against the invasive (microsporidiosis) and exogenous infections (nuclear polyedrosis). The preparation was used for nutrition of silkworm on hornbeam that allowed to reduce the time of cultivation and improve its productivity indexes. In case of carp spawn treatment by the biopreparation the output of larvae was 100%, while in control it didn’t exceed 74%.

Thus obtained biopreparation based on micromycetes can be used for preventive and medical purposes as biologically active additives.

Thus, using of joint cultivation of two strains of micromycetes allowed us to reduce the trms of fermentation and increase the content of biologically active substances in obtained preparation. Moreover, using the vitamin preparation not only increases the survival of animals, physiological and productivity indexes but also protected silkworm and fish against different diseases. These findings suggest the posibility using of preparation for animal nutrition and also for developing drugs based on it.

References:

1. *M. Wainwright* // Novel use for fungi in biotechnology - Chem. Ind.,1990, N 2., P. 131–134.
2. *Ch. Hobbs* // Medicinal mushrooms an exploration of tradition healing and culture – Botanica press.Santa Cruz, C.A. ,1995. 251 p.
3. *E. P. Feofilova, D. V. Nemtcev , V. M. Tereshina , V. P. Kozlov* // Polyaminosacharides of micromycetes: new biotechnologies and perspectives for practical using - Applied biochemistry and microbiology,1996, v.32, N 5, p. 483–492.

АНТАРКТИЧЕСКИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ – ПРОДУЦЕНТЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Таширев А.Б., Романовская В.А., Рокитко П.В., Матвеева Н.А.

Институт микробиологии и вирусологии им. академика Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина
e-mail victoriaroman@ukr.net

В зоне внутреннего островного шельфа Антарктического полуострова экосистемы подвержены одновременному воздействию целого комплекса экстремальных факторов. К ним относятся высокие дозы УФ радиации, циклическое «замораживание-оттаивание», высушивание, резкие перепады суточных температур, абразивное действие ветров, и т. д. На о. Галиндез расположены клифы - вертикальные скалы высотой 10-12 м, круглый год свободные от снега. Поэтому на микробные ценозы клифов в максимальной степени действуют указанные экстремальные факторы. Повышенный уровень УФ радиации приводит к природной селекции пигментированных микроорганизмов в данных экосистемах и к гиперсинтезу у них пигментов, как ответной защитной реакции. Защитные пигменты микроорганизмов (каротины, меланины и флавины) представляют собой биологически активные вещества, перспективные для промышленных биотехнологий.

Поэтому в экстремальных биотопах Антарктики нами был проведен скрининг пигментированных микроорганизмов. В результате показано, что в наскальных антарктических биотопах частота их встречаемости, а также общее количество и биоразнообразие значительно выше, чем в других антарктических биотопах [1, 2]. Из биоплёнок обрастания стационарных точек мониторинга на клифе «Скалодром-2» биогеографического полигона (о. Galindez, Станция Академик Вернадский) изолированы пигментированные микроорганизмы. Микроорганизмы представлены (клеток/г образца): розовыми и оранжево-жёлтыми формами бактерий (до 10^7), а также красными и чёрными дрожжами (до 10^5). Нами установлено, что пигментированные микроорганизмы антарктических скал высокоустойчивы к УФ радиации. Летальная доза УФ облучения для розовых штаммов *Methylobacterium* превышала 300 Дж/м^2, для угольно-чёрных дрожжей – 500-800 Дж/м^2, для красных дрожжей – 1200-1500 Дж/м^2.

Из изолированных бактерий и дрожжей экстрагированы пигменты. Проведен детальный хроматографический и спектрофотометрический анализ пигментов штаммов *Methylobacterium.* Показано, что их каротиноиды представлены преимущественно ксантофилами. Количественное содержание каротиноидов у *M. extorquens* составляло 0,23 мг/г сухого веса. Подобраны условия для эффективной экстракции пигментов из клеток розовоокрашенных штаммов *Methylobacterium.* Красные антарктические дрожжи являются продуцентами β-каротина и перспективны для использования в биотехнологии.

Особый интерес для биотехнологий имеют антарктические угольно-чёрные дрожжи *Exophiala nigra* с точки зрения промышленного получения меланина. Поэтому из четырёх штаммов *Exophiala nigra* были экстрагированы пигменты и изучены их свойства. По комплексу специфических химических тестов эти пигменты идентичны меланину, что подтверждается также характером их УФ-спектров (в области 220-230 нм) и спектров поглощения в видимой области (400-800 нм). Оптимизированы условия биосинтеза меланина. Выход меланина оценивали как количество АСМ меланина, синтезированного 1 г АСМ биомассы (АСМ – абсолютно сухая маса). Установлено, что у исследованных антарктических штаммов выход меланина составлял от 6 до 10 % АСМ клеток [3].

Полученные результаты позволяют считать, что адаптация микробных сообществ к высокому уровню УФ радиации происходит путём природной селекции микроорганизмов, у которых устойчивость к этому фактору генетически детерминирована. Видимо, в условиях повышенного уровня УФ радиации в Антарктике, преимущество для выживания на скалах получили микроорганизмы, которые имели эффективные механизмы репарации повреждений ДНК, и/или пигменты, защищающие клетки от УФ радиации. Пигментированные изоляты представляют собой перспективные продуценты для получения биологически-активных веществ (меланинов, каротинов), которые могут быть использованы в биотехнологиях. В настоящее время считается, что меланин перспективен для применения в медицине и фармакологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Национального антарктического научного центра Украины

Литература:

1. *O. Tashyrev, V. Romanovskaya, P. Rokitko, N. Matweeva, G. Tashyreva* // Structure and functions of microbial cenosis in model ecosystem of Antarctic oasis (biogeographical polygon of Galindez island) / In: Identification of Model Ecosystems in Extreme Environments - CAREX Publication 2. Workshop Proceedings, 2009, p. 31-32.
2. *O.B. Tashyrev* // Complex researches of structure and function of Antarctic terrestrial microbial communities - Ukrainian Antarctic Journal (Ukrainskyj antarktychnyj zhurnal ISSN 1727-7485), 2009, N 8, p. 228-242.
3. *А.Б. Таширев, В.А. Романовская, С.О. Шилин, Н.А. Черная* // Скрининг дрожжей-продуцентов меланина в наземных антарктических биотопах - Мікробіол. Журнал, 2010, т. 72, № 1, с. 3-10.

ANTARCTIC MICROORGANISMS, THE PRODUCERS OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Tashyrev O.B., Romanovskaya V.A., Rokitko P.V., Matvieieva N.A.

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of Ukrainian Nat. Acad. Sci., Kiev, Ukraine
e-mail victoriaroman@ukr.net

Ecosystems in inner areas of Antarctic Peninsula apron are subjected to the complex of extreme factors, such as high rates of UV radiation, freezing-thawing cycles, desiccation, significant temperature oscillations on a diurnal basis, abrasive effect of wind, etc. On the Galindez Island are located vertical cliffs of 10 to 12-meter height that are permanently free from snow cover. Therefore, cliff microbial cenoses are extremely exposed to the mentioned stress factors. Increased UV radiation rate leads to the natural selection of pigmented microorganisms in such ecosystems, and hence to the pigment hypersynthesis as a protective adaptation. Protective microbial pigments, e.g. carotenes, melanins, and flavins belong to biologically active substances promising for application in industrial biotechnologies.

Therefore, we have screened extreme Antarctic biotopes for pigmented microorganisms. It has been revealed consequently that the occurrence of such microorganisms in cliff biotopes is significantly higher, as well as their total number, and diversity comparing to other Antarctic biotopes. [1, 2]. Pigmented microorganisms were isolated from stationary points on Skalodrom-2 cliff located on 'Biogeographical Polygon' sampling site (Akademik Vernadsky Station, Galindez Island). Isolated microorganisms were represented by (in CFU/g dry sample) pink and yellowish-orange-pigmented bacteria (up to 10^7), as well as red and black-pigmented yeasts (up to 10^5). Our investigations have ascertained that Antarctic pigmented cliff microorganisms are highly resistant to UV radiation. Lethal dose of UV radiation exceeded 300 J/m^2 for pink *Methylobacterium* strains, from 500 to 800 J/m^2 for coal-black yeasts, and from 1200 to 1500 J/m^2 for red-pigmented yeasts.

Pigments were extracted from isolated yeasts and bacteria. *Methylobacterium* pigments were analyzed in detail employing chromatographic and spectrophotometric analyses. It was found that carotenoids were represented predominantly by xanthophylls. Content of carotenoids in *M. extorquens* biomass constituted 0.23 mg/g dry weight. The optimal conditions have been selected for the efficient pigment extraction from *Methylobacterium* pink-pigmented cells. Red-pigmented Antarctic yeasts have been found to be β-carotene producers, and considered as promising for application in biotechnology.

Coal-black *Exophiala nigra* yeasts are of particular interest for industrial melanin production. Therefore, pigments of 4 *E. nigra* strains were extracted, and their properties were investigated. According to the specific chemical tests, these pigments were identified as similar to melanin, which was proved additionally by the range of their UV (220-230 nm) and visible light absorption spectra (400-800 nm). The conditions for melanin biosynthesis have been optimized. Melanin yield was estimated as the amount of dry melanin synthesized by 1 g of yeast biomass recalculated for dry weight. The estimated yield of melanin in studied Antarctic strains constituted from 6 to 10% of biomass dry weight [3].

The results of this study allow considering that the adaptation of microbial communities to increased UV radiation rates occurs by means of natural microbial selection of microorganisms having genetically determined resistance to this factor. Apparently, the microorganisms which possess efficient DNA reparation mechanisms and/or UV-protective pigments have gained an advantage for survival on Antarctic bare cliffs exposed to increased UV radiation rate. Pigmented isolates represent the promising for biotechnological application producers of biologically active substances, i.e. melanins and carotenoids. Melanin is generally considered to be promising for application in pharmacy and medicine.

This work was supported by the National Antarctic Scientific Center of Ukraine

References:

1. *O. Tashyrev, V. Romanovskaya, P. Rokitko, N. Matweeva, G. Tashyreva* // Structure and functions of microbial cenosis in model ecosystem of Antarctic oasis (biogeographical polygon of Galindez island) / In: Identification of Model Ecosystems in Extreme Environments - CAREX Publication 2. Workshop Proceedings, 2009, p. 31-32.
2. *O.B. Tashyrev* // Complex researches of structure and function of Antarctic terrestrial microbial communities - Ukrainian Antarctic Journal (Ukrainskyj antarktychnyj zhurnal ISSN 1727-7485), 2009, N 8, p. 228-242.
3. *O. Tashyrev, V. Romanovskaya, S. Shilin, N. Chernaya* // Screening of a yeast-producers of melanin in terrestrial Antarctic biotopes – Microdiol. J. (ISSN 0201-8462), 2010, v. 72, N 1, p. 3-10 (in Russian)

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ РАСТИТЕЛЬНЫЕ ЭКСТРАКТЫ ДЛЯ КОСМЕТИКИ

Тимчук К.С., Железняк Т.Г., Ворнику З.Н.

Институт Генетики и Физиологии Растений., Академии Наук Республики Молдова, Кишинэу, Молдова
e-mail: igcanc@yahoo.com

Современная косметическая промышленность испытывает большую потребность в натуральных биологически активных веществах (БАВ) ароматических и лекарственных растений. В Республике Молдова на парфюмерно-косметической фабрике ”Viorica-Cosmetic SA” большой ассортимент косметических изделий производится с использованием экстрактов БАВ, полученных из сырья этих растений местной флоры и интродуцированных новых видов. В этих целях, за последние годы, были получены и изучены свыше 30 образцов экстрактов ароматических и лекарственных растений.

В данном сообщении приводятся результаты комплексных исследований водно-спиртовых экстрактов листьев мать-и- мачехи (*Tussilago farfara L.),* цветов акации (*Robinia Pseudoacacia L.*) и сирени (*Syringa vulgaris L.*), тысячелистника (*Achillea millefolium L.*). Экстракты были получены по разработанной нами технологической схеме и утвержденной, в установленном порядке, технологической инструкции. Дана комплексная оценка показателей качества опытных образцов экстрактов. Качественный и количественный анализ экстрактов на содержание аминокислот выполнен на приборе фирмы «Ково» ААА-339,№0326. Микро–и макроэлементы определялись методом эмиссионного спектрального анализа. Содержание витаминов, дубильных веществ, алколоидов определялось согласно существующих ГОСТов. Органолептические и физико-химические показатели определялись в соответствии с ГОСТ 14618.0-12-78.

Полученные результаты исследований подтверждают, что водно-спиртовые экстракты исследуемых растений содержат богатый набор аминокислот (АСП, ТРЕ, СЕР, АСН, ГЛУ, ГЛН, ПРО, АЛА, ВАЛ, МЕТ, ТИР, В-АЛА, ЛИЗ, ГИС, АРГ и др.), суммарное содержание которых варьирует в пределах 1,360-2,837мг/100г. Экстракты содержат также витамины B_2, С, B_6, РР, Р (1,17-10,70мг,%) и макроэлементы- K, Na, Ca, Mg, Zn, Fe (1,44-2,16-2,36-10,70-1,75-0,65мг/100мл соответственно). Содержание алколоидов и дубильных веществ варьирует в пределах 0,009-4,0%. Присутствие тяжелых металлов (Pb, Mn, Cr, Sn, Ni, Mo, V, Cu) в исследуемых экстрактах не выявлено. Характеристика органолептических и физико-химических (массовая доля сухих веществ, плотность, общая и активная кислотность и др.) показателей исследуемых экстрактов, а также их положительная медико-гигиеническая экспертиза является основанием для косметологов фабрики ”Viorica-Cosmetic SA” для включения этих экстрактов в рецептуры при производстве новых видов косметических изделий.

PLANT EXTRACTS WITH PERSPECTIVES FOR COSMETIC INDUSTRY

Timciuc K.S., Zheleznyak T.G., Vorniku Z.N.

Institute of Genetics and Plant Physiology of the Academy of Sciences of the Republic of Moldova, Chisinau, Moldova
e-mail: igcanc@yahoo.com

Cosmetics industry is experiencing great need for natural *bioactive substances* (*BAS*) that are accumulating in aromatic and medicinal plants. The cosmetic factory "Viorica-Cosmetic SA" is producing a wide range of cosmetic products using extracts of BAS obtained from the raw material from the local flora of the Republic of Moldova and introduced new species. For these purposes, during last year's, more than 30 samples of extracts from aromatic and medicinal plants with practical perspectives were obtained and studied.

The results of comprehensive studies of water-alcohol extract of leaves of coltsfoot (*Tussilago farfara L*), flowers of acacia (*Robinia Pseudoacacia L* .) and lilac (*Syringa vulgaris* L), yarrow (*Achillea millefolium* L) are presented in this report. Extracts were obtained according to our technological scheme and approved by technological instructions.

The complex estimation of quality of prototypes extracts is performed. Qualitative and quantitative analysis of amino acids in extracts is provided with "Covo" AAA-339, № 0326. Micro-and macronutrients were determined by emission spectral analysis. The content of vitamins, tannins, alkaloid was determined according to existing state standards. Organoleptic, physical and chemical parameters were determined in accordance with GOST 14618.0-12-78.

The obtained results showed that that the aqueous- alcohol extracts of the mentioned plants contained a large set of amino acids (TSA, TPE, SER, ASN, GLU, GLN, PRO, ALA, VAL, MET, TIR, B-ALA, LIZ, GIS, ARG, etc.), the total content of which varies from 1,360-2,837 mg/100g. The extracts also contain vitamins B2, C, B6, PP, P (1,17-10,70 mg%); alkaloid and tannins varies between 0.009-4,0%. The contents of microelements -K, Na, Ca, Mg, Zn, Fe is 1,44-2,16-2,36 -10.70-1,75-0,65 mg/100ml respectively. The presence of heavy metals (Pb, Mn, Cr, Sn, Ni, Mo, V, Cu) in tested extracts was not detected. Characteristics of the organoleptic and physico-chemical (mass fraction of solids, density, total and active acidity, etc.) parameters of the test extract, as well as their positive results of health and hygienic examination is the basis for their inclusion in formulations for the manufacture of new types of cosmetic products by the factory "Viorica-Cosmetic SA".

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ГУМИНОВОЙ, МЕЛАНОИДИНОВОЙ ПРИРОДЫ И ИХ ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ

Томсон А.Э., Наумова Г.В., Овчинникова Т.Ф., Жмакова Н.А., Макарова Н.Л., [1]Шурхай С. Ф.

Институт природопользования НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: zhmakova@mail.ru
[1]Полесский аграрно-экологический институт НАН Беларуси, Брест, Беларусь

Нарушение иммунобиохимического гомеостаза в процессе жизнедеятельности сельскохозяйственных животных и птицы оценивается специалистами как одна из главных причин снижения их выживаемости на ранних стадиях развития, низкой продуктивности при откормке молодняка крупного рогатого скота, свиней, а также снижения удоев у коров. Одним из проявлений нарушения внутреннего гомеостаза является активизация в организме животных свободнорадикальных процессов, в частности, перекисного окисления липидов, что приводит к повреждению мембран клеток и накоплению токсических продуктов, в результате чего могут возникать различные сбои в обмене веществ, а главное – в иммунном статусе организма [1,2]. Применение функциональной антиоксидантной системы, коррекции и стабилизации может обеспечить защиту организма и предотвратить снижение иммунитета у сельскохозяйственных животных.

Важнейшую роль в создании биологически активных добавок неспецифического действия, регулирующих обменные процессы и повышающих иммунитет организма, могут играть торф и отдельные отходы растительного сырья, содержащие в своем составе биологически активные соединения различных химических классов и, в частности, полифенолов. Так известно, что торф является богатым источником гуминовых веществ, относящихся к природным полифенолам, а такие растительные отходы, как ростки солода, какао-велла и лузга гречихи, могут служить источником «гуминоподобных веществ» – меланоидинов, образующихся в процессе их переработки.

В Беларуси разработаны биологически активные препараты из указанного сырья для животноводства и растениеводства, однако их антиоксидантные свойства не были исследованы [3].

В этой связи, как научный, так и практический интерес представляло изучение антиоксидантных свойств как самих препаратов гуминовой и меланоидиновой природы, так и их отдельных компонентов, которые могут быть ответственны за их антиоксидантные свойства.

Объектом исследования являлись гуминовые вещества верхового сфагнового торфа со степенью разложения 25 %, представленные гуминовыми и фульвокислотами, извлекаемыми из торфа водно-щелочными агентами стандартным методом, исследовались свободные низкомолекулярные фенольные соединения, извлекаемые 70 %-ным этиловым спиртом из торфа и растительного сырья, а также меланоидины, полученные путем их экстракции раствором гидроксида натрия.

Антиоксидантную активность выделенных фракций определяли в сравнении с кверцетином по методике [4], принятой при оценке активности фитопрепаратов пищевых и кормовых добавок. Анализ результатов проведенных исследований позволяет утверждать, что все фракции, выделенные из торфа и растительного сырья, обладают антиоксидантными свойствами.

Исследуемые фракции имели различную антиоксидантную активность. Так, если гуминовые кислоты и фульвокислоты проявляли соответственно активность равную 7,68 и 6,15 мг кверцетина на 1 мл, то у фракций растительных препаратов, в частности меланоидинов, данный показатель был на уровне 0,36—0,72 мг кверцетина на 1 мл. Активность фенольных фракций, выделенных спиртом из торфа и растительных отходов, составляла 0,8–1,6 мг кверцетина/мл. При этом наиболее высокий показатель относится к торфяной фенольной фракции, а самый низкий – к аналогичной фракции ростков солода. Фенольная фракция торфа проявляла несколько большую активность в сравнении с меланоидинами и составляла 1,55 мг кверцетина на 1 мл, но примерно в 3 раза меньшую, чем гуминовые вещества торфа. Следовательно, антиоксидантная активность продуктов, выделяемых из торфа, в большей мере может быть обусловлена веществами полифенольного характера, чем низкомолекулярными фенольными соединениями.

Исследовали также антиоксидантную активность самих препаратов: Гидрогумат (из торфа), Мальтамин (из ростков солода), Гарант (из лузги гречихи), Шеколин (из какао-веллы).

Выявлено, что биологически активный препарат Гидрогумат, в составе которого преобладают гуминовые вещества (до 65 %), в числе которых 50 % гуминовых кислот и 15 % фульвокислот в расчете на его органическую массу, проявляет наиболее высокие антиоксидантные свойства (21,4 мг кверцетина/мл). Среди препаратов, полученных из растительного сырья, этот показатель составляет 2,5–2,6 мг кверцетина/мл у Гаранта и Шеколина и лишь 0,8 мг кверцетина/мл у Мальтамина, что можно объяснить более высоким содержанием меланоидинов в препаратах из лузги гречневой и какао-веллы.

Следовательно, наиболее перспективными препаратами для повышения иммунного статуса и снятия оксидативного стресса у животных являются гуминовые препараты, в частности – Гидрогумат, обладающий высокой антиоксидантной активностью.

Литература:

1. *Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Земщиков* Окислительный стресс. М., 2001, 198 с.
2. *Р.А. Цыганский* Динамика свободнорадикального окисления у коров при различном функциональном состоянии: автореф. дис. … биол. наук Ставрополь, 2003, 20 с.
3. *А. Э. Томсон, Г.В. Наумова* Торф и продукты его переработки. Мн., 2009, 328 с.
4. *C.O. Beauchamp, I. Fridovich* Superoide dismutase Improved assays and an assays applicable to acrilamide gels // Anal. Biochem. 2000, Vol. 44, P 276–287.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PREPARATIONS OF HUMIC, MELANOIDIN ORIGIN AND SOME OF THEIR COMPONENTS

Thomson A.E., Naumova G.V., Ovchinnikova T.F., Zhmakova N.A., Makarova N.L., [1]Shurkhai S.F.

Institute for Nature management NAS of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: zhmakova@mail.ru
[1] Polessye agrarian-ecological institute, NAS of Belarus, Brest, Belarus

Disturbance of immune-biochemical homeostasis in the course of viability of agricultural animals and poultry is estimated by experts as one of the main reasons of decrease in their survival rate at early stages of evolution, low fattening efficiency of young cattle, pigs, and also decrease in cows milking. One of displays of disturbance of an internal homeostasis is activization in an organism of animal of free-radical processes, in particular, lipids peroxide oxidations , that leads to disturbance of cells membranes and accumulation of toxic products, therefore there can be various failures in metabolism and as important - in the immune status of an organism [1,2]. Application of functional antioxidant system, correction and stabilization can provide protection of an organism and prevent decrease in immunity of agricultural animals.

In creating biologically active additives of nonspecific action to regulate exchange processes and to raise immunity of an organism, peat and some waste of vegetative raw materials in the structure of biologically active compounds of various chemical classes and, in particular, of poly-phenols can play the major role. So it is known, that peat is a rich source of humic substances referring to natural polyphenols, and such vegetative waste as malt sprouts, cocoa-vella and buckwheat shells can be a source of “humus-like substances “ – melanoidins , formed in the course of their processing.

From the specified raw materials biologically active preparations for animal industries and plant growing have been developed in Belarus, however their antioxidant properties have not been investigated [3].

Thereupon, both scientific and practical interest was represented by studying antioxidant properties of preparations proper of humic and melanoidin origin, and some of their components which can be responsible for their antioxidant properties.

The research object were humic substances of raised sphagnum peat of 25 % decomposition degree, presented by humic and fulvic acids, aqueous-alkaline agents extracted from peat by standard method; free low-molecular phenol compounds were investigated extracted by 70 % ethyl spirit from peat and vegetative raw materials, and also melanoidins , through their extracting by sodium hydroxide solution.

Antioxidant activity of the extracted fractions was defined comparing to quercetin by a technique [4] accepted at an estimation of activity of phytopreparations of food and fodder additives. The results analysis of made researches allow to assert, that all fractions extracted from peat and vegetative raw materials have anti-oxidant properties.

Investigated fractions had various antioxidant activity. So, if humic and fulvic acids accordingly showed activity equal to 7,68 and 6,15 mg of quercetin per 1 ml, then fractions of vegetative preparations, melanoidins in particular, had this indicator at the level of 0,36-0,72 mg quercetin per 1 ml. Activity of the phenol fractions extracted with spirit from peat and vegetative waste, made up 0,8-1,6 mg of quercetin /ml. Thus the highest indicator refers to peat phenol fraction, and the lowest - to similar fraction of malt sprouts. The phenol fraction of peat exposed some higher activity in comparison with melanoidins and made 1,55 mg of quercetin per 1 ml, but approximately 3 times less, than humic peat substances . Hence, antioxidant activity of the products extracted from peat, to greater extent may be caused by substances of polyphenol character, than low-molecular phenol compounds.

An antioxidant activity of preparations themselves: Hydrohumat (from peat), Maltamin (from malt sprouts), Guarant (from buckwheat shell), Shekolin (from cocoa-velly) was also investigated.

It has been revealed, that biologically active preparation Hydrohumat in which structure humic substances prevail (to 65 %), including 50 % of humic and 15 % fulvic acids counting per its organic weight, shows the highest antioxidant properties (21,4 mg of quercetin/ml). Among the preparations obtained from vegetative raw materials, this indicator makes 2,5-2,6 mg of quercetin /ml in Garant and Shekolin and only 0,8 mg of quercetin/ml in Maltamin, that can be explicit by higher content of melanoidins in preparations from buckwheat shell and cocoa-vella.

Hence, the most perspective preparations to enhance the immune status and to remove oxidative stress among animals are humic preparations, in particular – Hydrohumat, being of high antioxidant activity.

References

1. *N.K. Zenkov, V.Z.Lankin, E.B.Zemshchikov.* Oxidative stress.M., 2001, 198 p.
2. *R.A. Tsiganskiy* Dinamics of free radicak oxidation in cows at various functional state: autoref…boil sciences., Stavropol, 2003, 20 p.
3. *A.E. Tomson, G.V. Naumova.* Peat and products of its processing. Mn., 2009, 328 p.
4. *C.O. Beauchamp, I. Fridovich* Superoide dismutase Improved assays and an assays applicable to acrilamide gels // Anal. Biochem. 2000,Vol.44, P 276–287.

АНАЛИЗ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ПЛОДОВ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ И КЛИАТИПОВ ОБЛЕПИХИ КРУШИНОВИДНОЙ

Флюрик Е.А., Лазовская О.И., Леонтьев В.Н., Шутова А.Г., Спиридович Е.В., Гаранович И.М.

БГТУ, ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Беларусь
e-mail: leontiev@bstu.unibel.by

В результате проведенного хроматографического анализа показано, что жирнокислотный состав липидов выделенных из масла, кожицы и семян плодов облепихи крушиновидной различных сортов и климатипов индивидуален и может служить целям идентификации образцов облепихи различного происхождения.

В работе были использованы плоды облепихи следующих сортов: Трофимовская, Любительская, Ароматная, Обильная, Самородок, Улыбка, Отрадная, Безколючковая, а также климатипов: Северо-кавказский, Прибалтийский, Сибирский. Для определения жирнокислотного состава использовали масло, кожицу и семена данной культуры. Для получения масла из измельченных и растертых плодов облепихи выделяли жидкую фракцию, из которой после центрифугирования отбирали масло. Семена промывали в дистиллированной воде и после просушивания измельчали. Кожицу после отделения от мякоти также многократно промывали в дистиллированной воде.

Микронавески образцов масел, размельченных семян, кожицы плодов помещали в раствор 2% серной кислоты в абсолютном метаноле, содержащей гептадеканоевую кислоту - С 17:0 (внутренний стандарт) и подвергали метанолизу при 80˚С для получения метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК).

МЭЖК экстрагировали гексаном и проводили анализ на хроматографе Hewlett-Packard 4890 D, оснащенном пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой HP-Innowax 0.32 мм х 30 м с использованием в качестве неподвижной фазы полиэтиленгликоля (0,5 мкм). Анализ проводили при скорости потока гелия 26 см³/с; температуре колонки 220˚С, инжектора и детектора – 250˚С. Индивидуальные жирные кислоты идентифицировали по времени удерживания при разделении стандартных смесей этих веществ (Supelco Park, USA) и оценивали в процентах от их общего содержания.

Наибольшее содержание пальмитиновой кислоты (16:0) наблюдалось в масле и кожице облепихи (21,2 –39,15% и 24,77-32,77%). Содержание пальмитиновой кислоты в семенах было низким во всех образцах (6,97-8,55%). В семенах также наблюдалось невысокое содержание пальмитолеиновой кислоты (16:1) (не превышало 0,81%), в то время, как эта мононенасыщенная кислота наряду с пальмитиновой была превалирующей в масле и кожице. Во всех образцах, за исключением Северо-кавказского климатипа, наблюдалось высокое содержание пальмитолеиновой кислоты в масле и кожице. Отличительной особенностью семян облепихи было высокое содержание линолевой (18:2) и линоленовой (18:3) кислот.

При сравнении изучаемого разнообразия в накоплении жирных кислот отмечено, что наиболее значимые отличия наблюдались в жирнокислотном составе кожицы облепихи. Так, образцы Северо-кавказского и Сибирского климатипов отличались пониженным содержанием пальмитолеиновой кислоты (10,93 и 14,99% соответственно), а сорта Ароматная и Отрадная - ее наибольшим содержанием (36,68 и 37,57% соответственно). Сорта Трофимовская и Ароматная характеризовались низким содержанием олеиновой кислоты (18:1). Образцы сорта Безколючковая, а также Сибирского, Прибалтийского и Северокавказского климатипов содержали низкое количество линолевой кислоты.

Степень варьирования жирнокислотного состава липидов семян невелика. Лишь для Прибалтийского климатипа отмечено повышенное количество цис-изомера олеиновой кислоты (22,39%). Во всех других образцах наблюдались незначительные колебания в распределении полиненасыщенных 18-карбоновых кислот.

Наибольшие отличия в жирнокислотном составе масел показаны для Северо-кавказского климатипа, что выражалось в низком уровне накопления 16-карбоновых кислот в масле, и повышенном содержании стеариновой кислоты (18:0). Заметные отличия масляной фракции Северо-кавказского и Прибалтийского климатипов выражались также в повышенном содержании олеиновой кислоты (17,56 и 17,6%) и пониженном содержании линолевой кислоты (2,62 и 6,14% соответственно) в сравнении с другими образцами.

Анализ различий жирнокислотного состава позволил нам выделить четыре группы, различающиеся по количественным показателям накопления жирных кислот в масле, семенах и кожице облепихи:

1 – Трофимовская, Любительская, Ароматная, Обильная, Самородок, Улыбка, Отрадная. Близким к этой группе является также жирнокислотный состав плодов Сибирского климатипа, имеющий наиболее значительные отличия от остальных образцов в этой группе повышенным содержанием пальмитоолеиновой кислоты в кожице.

2 – Северо-кавказский климатип, имеющий наибольшую индивидуальность в биосинтезе жирных кислот как в кожице, так и в масле.

3 – Прибалтийский климатип, для которого показана индивидуальность распределения жирных кислот в масле и семенах.

4 – Безколючковая форма облепихи, имеющая значительные отличия в жирнокислотном составе кожицы.

THE ANALYSIS OF BERRIES FATTY ACID COMPOSITION OF VARIOUS SEA BUCKTHORN VARIETIES AND CLIMATYPES

Flyurik E.A., Lazovskaya O.I., Leontev V.N., Shutava H.G., Spiridovich A.V., Garanovich I.M.

BSTU, CBG of NAS of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: leontiev@bstu.unibel.by

As a result of chromatographic analysis it is shown that fatty acid composition of lipids allocated of oil, thin skin and seeds of sea buckthorn berries various varieties and climatypes is individual and can serve the purposes of identification of sea buckthorn berries of a various origin.

Sea buckthorn berries of following varieties and climatypes have been used In work: Trofimovskaja, Lubitelskaya, Aromatnaya, Obilnaja, Samorodok, Ulibka, Otradnaya, Bezkoluchkovaya, North Caucasian, Baltic, Siberian. For definition fatty acid composition used oil, thin skin and seeds of the given culture. For reception of oil from the crushed and pounded of sea buckthorn berries allocated liquid fraction from which after centrifugation selected oil. Seeds washed out in the distilled water and crushed after drying. A thin skin after branch from pulp also repeatedly washed out in the distilled water.

Microhinge plates of samples of oils, crushed seeds, thin skins of fruits placed in a solution of sulfuric acid of 2 % in the absolute methanol, containing geptadecanoic acid (17:0) (the internal standard) and expose to methanolysis at 80˚C for reception of methyl ethers of fat acids.

Methyl ethers of fat acids extracted with hexane also carried out the analysis on chromatograph Hewlett-Packard 4890 D, equipped flame ionization detector and capillary column HP-Innowax of 0.32 mm x 30 m with use polyethylene glycol as a fixed phase (0,5 microns). The analysis spent at speed of a stream of helium of 26 sm ^{3}/c; column temperature 220˚C, injector and the detector temperature – 250˚C. Individual fat acids identified on retention time at division of standard mixes of these substances (Supelco Park, USA) and estimated in percentage of their general content.

The greatest content of palmitic acid (16:0) was observed in oil and sea buckthorn berries thin skin (21,2-39,15 % and 24,77-32,77 %). The amount of palmitic acid in seeds was low in all samples (6,97-8,55 %). The amount of palmitoleinic acids (16:1) (didn't exceed 0,81 %) was low while domination of this mononsaturated acid along with palmitic acid in oil and thin skin was observed. In all samples, except for North Caucasian climatype, the high amount of palmitoleinic acid in oil and a thin skin was observed. The high content of linoleic (18:2) and linolenic (18:3) acids was distinctive feature of seeds of sea-buckthorn berries.

At comparison of studied variety in accumulation of fat acids it is noticed that the most significant differences were observed in fatty acid composition of thin skin of sea buckthorn berries. Samples of North Caucasian and Siberian climatypes differed the lowered amount of palmitoleinic acids (10,93 and 14,99 % accordingly), and varieties Aromatnaya and Obilnaja - greatest amount (36,68 and 37,57 % accordingly). Varieties Trofimovskaja and Aromatnaja were characterized by the low amount of oleinic acid (18:1). Samples of Bezkoljuchkovaja, and also Siberian, Baltic and North Caucasian contained low quantity of linoleic acid.

Variation degree fatty acid composition of seeds lipids is insignificant. The raised quantity of a cis-isomer oleinic acid (22,39 %) was shown only for Baltic climatypes. In all other samples insignificant fluctuations in distribution of polyunsaturated 18- carbonic acids were observed.

The greatest differences in fatty acid composition of oils are shown for North Caucasian climatypes that was expressed in low level of accumulation 16-carbonic acids in oil and the raised amount of stearinic acid (18:0). Appreciable differences of oil fraction North Caucasian and Baltic climatypes were expressed also in the raised amount of oleinic acid (17,56 and 17,6 %) and the lowered content of linoleic acid (2,62 and 6,14 % accordingly) in comparison with other samples.

The analysis of fatty acids distinctions has allowed us to allocate four groups differing on quantity indicators of accumulation of fat acids in sea buckthorn berries thin skin, oil and seeds :

1 – Trofimovskaja, Lubitelskaya, Aromatnaya, Obilnaja, Samorodok, Ulibka, Otradnaya. Close to this group is also fatty acid composition of Siberian climatypes berries, having the most considerable differences from other samples in this group the raised amount of palmitoleinic acid in thin skin.

2 – North Caucasian climatype, having the greatest individuality in biosynthesis of fat acids both in a thin skin, and in oil.

3 – Baltic climatypes for which individuality of distribution of fat acids in oil and seeds is shown.

4 – Bezkoljuchkovaja - the form of sea buckthorn berries having considerable differences in fatty acid composition of a thin skin.

БІОЛОГІЧНО-АКТИВНІ РЕЧОВИНИ У СКЛАДІ РОСЛИН РІЗНИХ ВИДІВ РОДУ *PELARGONIUM* L'HER.EX AIT

Чихман О.М.

Ботанічний сад імені академіка О.В.Фоміна ННЦ «Інститут біології»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка
e-mail: lesha_@bigmir.net

У Ботанічному саду імені академіка О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка проводиться робота по створенню колекції видів роду *Pelargonium* L'Her Ait,. На сьогодні колекція нараховує 55 видів, що належать до 15 секцій (*Ciconium*, *Chorisma*, *Myrrhidium*, *Quercetorum*, *Campylla*, Otidia, *Cortusina, Peristera, Reniformia, Poliactium, Gibbosum, Pelargonium*, *Glaucophyllum*, *Hoarea*, *Ligularia)*. Насіння надходило переважно з ботанічних садів Німеччини, Франції, Італії, Чехії, Нідерландів, Монако і Росії. Інтерес до біологічно-активних речовин виник вже в середині дев'ятнадцятого століття, коли ефірна олія стала застосовуватись при виготовленні парфумів.Ефірна олія цієї рослини характеризуються приємним запахом. До складу ефірної олії пеларгонії входять: цитронелол (54 – 60%), гераніол (1,02%), ліналол (5,48%), ментол (3,9%), монотерпени (1%), сесквітерпени (1%), тиглінова кислота (12%). Ефірна олія пеларгонії в основному складається з терпенових спиртів. У складі ефірів були виявлені 11 різних кислот, серед яких мурашина, оцтова, пропіонова, капронова, капрілова і тиглінова.Відомо, що ефірні олії безпосередньо впливають на центральну нервову систему. Посилюють утворення умовних рефлексів, мають транквілізуючу та седативну дію. Терпеноїди тонізують центральну нервову систему, захищають її у випадку стресів. Терпенові сполуки також виявляють спазмолітичну активність. Вони можуть ефективно пригнічувати спонтанну рухову активність, будучи антагоністами ацетилхоліну, хлористого барію та гістаміну. Експериментально доведено виражений вплив терпеноїдів на серцево-судинну систему. У багатьох випадках відмічено, що терпеноїди і ефірні олії сприяють пониженню артеріального тиску. Гіпотензивний ефект може мати різну ступінь дії, від 10 - 20% до 90% від початкового тиску. Він супроводжується, як правило, збільшенням амплітуди серцевих скорочень, уповільненням їх темпу, розширенням коронарних судин та збільшенням коронарного кровотоку.

За літературними даними, відомо, що рівень природної концентрації летких органічних речовин в повітрі над рослинами *Pelargonium* значно нижчий за критичні (токсичні) концентрації, які можуть негативно впливати на організм людини. В деяких випадках ця концентрація навіть нижча рівня ступеня відчуття запаху. Але здатність летких терпеноїдів виявляти біологічну активність в діапазоні природних концентрацій, що створюють навколо себе рослини, досліджена недостатньо. Існує мало даних про біологічну дію парів терпеноїдів. Вони не піддавались системному аналізу. Як правило, активність даних речовин вивчали без урахування концентрації в повітрі, або в концентраціях, що значно перевищують природні. В процесі досліджень по санації повітряного середовища приміщень де присутні люди і спостережень за дією парів ефірних олій на хворих з захворюваннями легенів встановлено, що вони нормалізують кров'яний тиск, а також мають виражену заспокійливу дію. Особливо санація повітря необхідна в дитячих закладах, основною проблемою яких у міжсезонні періоди є інфекційні захворювання, які передаються повітряно-крапельним шляхом.Отже пеларгонії впродовж багатьох тисячоліть широко використовуються в народній медицині Африки, Австралії, Мадагаскару, Єгипту. Особливо активну протимікробну дію має свіжий сік пеларгонії. Інгаляція та часте вдихання аромату рослини сприяє швидкому перебігу запальних хвороб горла, ротової порожнини та дихальних шляхів. Десятихвилинне вдихання запаху пеларгонії знизить тиск у гіпертоніків та допоможе швидко заснути при безсонні. Екстракт із кореня пеларгонії рожевої (*P. radula*) виводить туберкульозні токсини і вражає бацили Коха. Південноафриканські цілителі здавна лікували туберкульоз легенів відваром з кореня пеларгонії. Лікування екстрактом пеларгонії особливо цінне при алергічних реакціях хворого на антибіотики. У Чехії та Болгарії ефірна олія офіційно визнана як антисептичний та протиревматичний засіб. Найсильнішу антифунгіцидну дію має олія із пеларгонії головчастої (*P. capitatum* Ait.).

Литература.

1.Geranium and pelargonium Edited by Maria Lis-Balchin.-London.-2002, - 318 p.

BIOACTIVE SUBSTANCES IN A STRUCTURE OF PLANTS FROM DIFFERENT SPECIES OF GENUS PELARGONIUM L'HER.EX AIT.

Chykhman O.M.

SEC "Institute of biology" Fomin botanical garden, Kyiv National Taras Shevchenko University
e-mail: lesha_@bigmir.net

In the Botanical garden named after academic O.V.Fomin at Taras Shevchenko National University of Kiev are carring out works on creation of collection of species of genus Pelargonium L'Her.ex Ait. For present the collection includes of 55 specie, belonging to 15 section (Ciconium, Chorisma, Myrrhidium, Quercetorum, Campylla, Otidia, Cortusina, Peristera, Reniformia, Poliactium, Gibbosum, Pelargonium, Glaucophyllum, Hoarea, Ligularia). Seeds primarily have been coming in from Botanical gardens of Germany, French, Italy, Czech, Netherlands, Marocco and Russia.

Interest regarding bioactive materials arose already in the middle of nineteenth century, when essential oil began to be used for making of perfumeries.

Essential oil of Pelargonium is marked by a pleasant scent and is composed of: citronellol (54 – 60%), geraniol (1,02%), linalol (5,48%), Mentholum (3,9%), mono terpadieness (1%), sesquiterpenes (1%), tiglinova acid (12%). Thus, established that essential oil of pelargonium mainly consists of terpene alcohols (pic.1). As a part of ethers were specified 11 different acids, among which ant, vinegar, propionic, kapron, kaprilova and tiglic.

It is known that essential oils influence directly on a central nervous system. Strengthen formation of association reflexes, have trankuilizing and sedative effects. Terpenoids tone up central nervous system, protect it in stresses. Terpenic connections also demonstrate antispasmodic activity. Being antagonists of acetylcholine, barium chloride and histamine they can effectively repress spontaneous motion.

Expressed influence of terpenoids on the cardiovasculare system is experimentally proved. It is remarked in many cases, that terpenoids and essential oils are favourable for lowering of arterial tension. Hypotension effect may be of various action degree, started with 10 - 20% up to 90% in comparison qwith the initial pressure. Typicaly it's accompanied with increase of cardiad contractions amplitude deceleration of their rate, distention of coronary vessels and increase of coronary blood stream.

According to literary sources, natural concentration level of organic volatiles in the air above the Pelargonium plants is considerably below the critical (toxic) concentration, which can negatively influence human organism. In some cases this concentration is even lower the smelling degree level.

However, the ability of volatile terpenoids to determine biological activity whereas natural concentrations, created by the plants, is not explored good enough. There are very few facts about biological activity of terpenoids vapours.

As a rule, the activity of those components was studied without considering the concentration in the air, or with concentrations which considerably exceeded the natural level.

Within the research about air sanation in the room with people and influence of essential oil on people with lung diseases, it was discovered that they normalize blood pressure and exert calming effect.

Sanation of air is necessary especially in child's establishments,where the basic problem during interseasonal periods are infectious air-communicable diseases. Beside anti-virus properties and antibacterial effect, directed against staphylococcuss and streptococcuss were discovered.

Thus during many millenniums Pelargoniums are widely used in altemative medicine of Africa, Australia, Madagascar, Egypt. Fresh juice of Pelargonium has especially active antimicrobic action. Inhalation and frequent inspiration of the plant's aroma aids run of throat, oral cavity and respiratory tracts inflammatory illnesses.

Ten minutes inhalationusing Pelargonum reduces pressure for hypertensive patient and helps to fall asleep quickly in case of sleeplessness. Extract from the root of Pelargonium pink (P.radula) removes tubercular toxins and strikes the bacilli of Koch. Healers of South African down the ages treated a white plague using herbal infusion with the root of Pelargonium. Treatment with the extract of Pelargonium is especially valuable when patient has allergic reactions with regard to antibiotics. The strongest antifungal effect has the oil of Pelargonium capitatum (P. of capitatum of Ait.).

References:

1.Geranium and pelargonium Edited by Maria Lis-Balchin.-London.-2002, - 318 p.

СПОСІБ ОТРИМАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОГО БІЛКОВО-МІНЕРАЛЬНОГО КОМПЛЕКСУ

Шаркова Н.О., Авдєєва Л.Ю., Жукотський Е.К., Козак М.М.

Інститут технічної теплофізики НАН України, Київ, Україна
e-mail: sharkova2007@ukr.net

Кожна п'ята людина в світі скаржиться на запалення або обмеження рухів в суглобах. Хворі із болями у суглобах за частотою звернень до лікарів займають друге місце після гострих респіраторних захворювань. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я 4% населення земної кулі страждають захворюваннями опорно-рухового апарату [1].

Лікування та профілактику захворювань опорно-рухового апарату проводять за допомогою медикаментозної терапії, фізіотерапії, лікувальної гімнастики, тощо. Особливо важливе місце при цьому займає спеціальна дієта. Лікарі рекомендують вживати медичні препарати (комплекси) з біологічно активним кальцієм та продукти з його високим вмістом – молочні продукти, бобові, рибу. До того ж в раціон харчування необхідно вводити продукти, збагачені компонентами, що необхідні для відновлення хімічного складу колагенвмісних тканин та кісток рухового апарату. Цінним джерелом комплексу таких компонентів можуть бути продукти отримані з природного матеріалу – а саме, вторинних продуктів переробки сільськогосподарських тварин і риб [1, 2].

На сьогодні, розробка нових сучасних технологій раціональної переробки вторинної сировини залишається актуальною задачею і потребує нових рішень. Відомі технології переробки колагенвмісної сировини ВРХ, які за рахунок процесів гідротермічної обробки, дезінтеграції, лужно-кислотної обробки, фільтрації та сушіння дозволяють отримувати цінні харчові продукти: бульйонні концентрати, кістковий харчовий білок, м'ясо-кісткові пасти, кісткове борошно, харчовий кістковий фосфат, тощо [3].

Для створення продуктів оздоровчої дії при захворюваннях опорно-рухового апарату економічно доцільною сировиною є субпродукти птахівництва, оскільки широке промислове розведення птиці забезпечує стабільність вихідної сировинної бази а її невисока вартість гарантує невелику вартість кінцевого продукту. В Украйні птахівнича галузь безперечно є лідером серед інших галузей тваринництва з виробництва продуктів харчування тваринного походження. Однак, головною метою птахівництва України має бути не тільки виробництво повноцінних продуктів харчування, але і створення безвідходних технологій, які дозволяють раціонально використовувати цінну біологічну сировину вторинних продуктів переробки. За існуючими технологіями така сировина, здебільшого, переробляється на кормові продукти: кісткове та м'ясо-кісткове борошно, концентрати та ін. [1, 3].

Розробка та впровадження високих безвідходних технологій переробки птиці дозволить розширити асортимент не тільки за рахунок виробництва якісних повноцінних продуктів харчування, але й отримувати натуральні профілактичні продукти спеціального призначення, які будуть корисними при лікуванні захворювань опорно-рухового апарату, при порушеннях мінерального обміну та підвищених фізичних навантаженнях.

Вихід вторинних продуктів при забої птиці складає до 20% з яких 3,4% становить м'язовий шлунок, 4,8% - голова та шия, 4,3% - лапи та 7,5% - це решта технічних відходів. Проведений аналіз хімічного складу лап птиці показує високий вміст білків (18-24%), ліпідів (8-9%), мінеральних речовин (5-6%) [3]. Білок представлений в основному колагеном та еластином. Аналіз його амінокислотного складу показує, що білок лап птиці за вмістом незамінних амінокислот дуже близький до складу білка колагену людини. До складу ліпідів входить 14% поліненасичених жирних кислот (олеїнова, лінолева та ліноленова кислоти). Мінеральні речовини представлені: фосфором, магнієм, калієм, залізом, цинком і особливо великою кількістю кальцію. Його вміст становить 60-65% від вмісту всіх макро- та мікроелементів [3]. Таким чином, лапи птиці представляють собою цінну сировину, яка має досить високу харчову та біологічну цінність.

З метою створення ресурсозберігаючої технології виробництва нового харчового продукту лікувально-профілактичного призначення нами були проведені дослідження по визначенню раціональних умов та параметрів екстрагування розчинних біологічно-активних речовин даного виду сировини. В результаті проведених досліджень нами була обрана речовина-естрагент (для інтенсифікації процесу екстракції білків і мінералів) та її концентрація, спосіб подрібнення, раціональні значення гідромодуля екстрагування, тривалості і температури проведення процесу.

Результати досліджень дозволили розробити технологію переробки продукції птахівництва – лап с/г птиці і отримати цінний харчовий продукт – білково-мінеральний концентрат (БМК), який можна використовувати з профілактичною метою при лікуванні захворювань опорно-рухового апарату. Цей продукт виготовлено без використання агресивних речовин (лугів, неорганічних кислот та інш.), що робить його безпечним до вживання. Отриманий природний БМК містить 70-75% білка і 10% мінеральних речовин, з яких 50-60% складає кальцій. При цьому мінеральні речовини виключно кісткового походження, а 50% білка екстракту знаходиться у гідролізованій формі, що легко засвоюється.

Література:

1. *Заболотных И.И.* Болезни суставов. – СПб.: СпецЛит, 2005. – 220 с.
2. *Абрамченко В.В.* Профилактика и лечение нарушений обмена кальция в акушерстве, гинекологии и перинатологии. СПб: ЭЛБИ-СПб. – 2006. – 240 с.
3. *Антипова Л.В., Глотова И.А.* Использование вторичного коллагенсодержащего сырья мясной промышленности. – СПб: ГИОРД, 2006. – 384 с.

THE METHOD OF BIOLOGICALLY ACTIVE PROTEIN-MINERAL COMPLEX FORMATION

Sharkova N.A., Avdyeyeva L.Yu, Zhukotsky E.K., Kozak M.M.

Institute of Engineering Thermophysics, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: sharkova2007@ukr.net

Every fifth person in the world complains of inflammation or limitation of motion in joints. Patients with pain in the joints are second after acute respiratory diseases by the frequency of appeals to doctors. According to the data of the World Health Organization, 4% of the world population suffering from diseases of the musculoskeletal system [1].

Treatment and prevention of diseases of the musculoskeletal system are conducted by drug therapy, physical therapy, medical gymnastics, and more. A special diet is especially important in this case. Doctors recommend taking medicines (complexes) and foods with biologically active calcium: dairy products, beans and fish. In addition products enriched with ingredients that are necessary to restore the chemical composition of collagen tissue and bone disorders must be also included to the diet. Valuable source of such complex components may be products derived from natural materials such as secondary processed products of farm animals and fish [1, 2].

Nowadays, the development of new technologies of rational recycling remains important task and requires new solutions. Technologies of raw bovine collagen are well known. Due to hydrothermal processes processing, disintegration, alkali-acid treatment, filtration and drying they enable to get valuable food: bouillon concentrates, bone protein food, meat and bone paste, bone meal, edible bone phosphate , etc. [3].

In order to create health products against diseases of the musculoskeletal system raw materials are economically feasible as wide industrial poultry breeding ensures the stability of the original resource base and its low cost ensures low cost of the final product. In Ukraine poultry industry is undoubtedly the leader among the other branches of the animal food of animal origin. However, the main objective of poultry in Ukraine should be not only production of food but also a waste-free technologies to use valuable biological raw material of secondary processed products efficiently. According to existing technologies such stuff is mostly processed into feed products: meat, bone and bone meal, concentrates and others. [1, 3].

Development and implementation of high poultry processing waste technologies will expand the range of not only the production of high quality full of food, but also receive prophylactic natural products of special purpose that will be useful in treating diseases of the musculoskeletal system, disorders of mineral metabolism and increased physical activities.

Output of secondary products during slaughter of poultry is up to 20% of which 3,4% is muscular stomach, 4,8% - head and neck, 4,3% - 7,5% and legs - the rest is technical waste. The analysis of the chemical composition of the jaws of birds shows a high protein content (18-24%), lipids (8-9%), minerals (5-6%) [3]. Protein is represented mainly by collagen and elastin. Analysis of its amino acid composition shows that the protein content of poultry paws essential amino acids is very close to the human collagen protein. The composition of lipids includes 14% polyunsaturated fatty acids (oleic, linoleic and linolenic acid). Minerals are represented by phosphorus, magnesium, potassium, iron, zinc and especially lots of calcium. Its content is 60-65% of the content of macro-and micronutrients [3]. Thus, the legs of poultry are a valuable material, which has a high nutritional and biological value.

In order to create a new resource-saving production technology food health care appointment we have carried out research to determine rational terms and parameters extraction of soluble biologically active substances of this type of material. As a result of the research we chose substance-estrahent (to intensify the process of extraction of proteins and minerals) and its concentration, method of reduction, the rational values of hydraulic extraction, duration and temperature of the process.

The research results allowed us to develop technology for processing of poultry products - paws of agricultural and poultry to gain valuable foods - protein-mineral concentrate, which can be used for prophylactic purpose in treating diseases of the musculoskeletal system. This product is manufactured without the use of corrosive substances (alkali, inorganic acids, etc..), and is safe for consumption. The final natural produst contains 70-75% protein and 10% minerals, of which 50-60% is calcium.

References:

1. *Заболотных И.И.* Болезни суставов. – СПб.: СпецЛит, 2005. – 220 с.
2. *Абрамченко В.В.* Профилактика и лечение нарушений обмена кальция в акушерстве, гинекологии и перинатологии. СПб: ЭЛБИ-СПб. – 2006. – 240 с.
3. *Антипова Л.В., Глотова И.А.* Использование вторичного коллагенсодержащего сырья мясной промышленности. – СПб: ГИОРД, 2006. – 384 с.

НОВЫЕ СТЕРОИДНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ РЯДА ХОЛЕСТАНА ИЗ СЕМЯН *PHYSALIS FLORIDANA RYDB*. СТРОЕНИЕ ФЛОРИДАНОЗИДОВ *B* И *C*

Швец С.А., Кинтя П.К., Марченко А.А.

Институт Генетики и Физиологии Растений АНМ, Кишинёв, Республика Молдова
e-mail: lexmarcenco@mail.ru

Представители рода *Physalis* (сем. *Solanaceae*) являются источниками витастероидов [1], в основном витанолидов и физалинов. Многие из этих соединений проявляют противовоспалительное, противоопухолевое, гепатопротекторное, иммуномодулирующее и цитотоксическое действие [1, 2].

В наших исследованиях изучали строение стероидных гликозидов ряда холестана семян *Physalis floridana Rydb*. С помощью гель-фильтрации на сефадексе и адсорбционно-распределительной хроматографии на силикагеле суммы гликозидов, полученной из метанольного экстракта, выделили индивидуальные гликозиды, названные нами флориданозидами B (**1**) и C (**2**).

Каждый из флориданозидов подвергли полному кислотному гидролизу, в результате которого выделили генин с $T_{пл.}$ 198 – 199°C, $[\alpha]_{20}^{D}$ □ 89.7°, (c 0.4, $CHCl_3$), ИК, λ_{max}: 3450, 2970, 1635, 1255, 1160, 1030 cm^{-1}. Масс-спектр ESI-MS показал основной пик молекулярного иона *m/z* 435 $[M + H]^+$. Таким образом, его молекулярная формула представлена $C_{27}H_{46}O_4$, что было подтверждено HR-MALDI-MS.

В олигосахаридной части для каждого гликозида с помощью тонкослойной хроматографии в присутствии заведомых свидетелей идентифицировали глюкозу и рамнозу.

Спектре ^{1}H ЯМР генина показал сигналы трех метильных групп при δ 0.94 м.д. (3H, s, Me-18), 0.8 м.д. (3H, d, J=7.1 Гц, Me-21) и 1.28 м.д. (3H, d, J=6.0 Гц, Me-27), сигналы двух метиновых протонов при δ 3.67 м.д. (1H, m, H-3) и 3.65 м.д. (1H, m, H-22), свидетельствующие о вторичной спиртовой функции, сигналы четырёх метиленовых протонов при δ 3.58 м.д. (1H, m, H-19α), 3.88 м.д. (1H, m, H-19β), 3.42 м.д. (1H, m, H-26α) и 3.79 (1H, m, H-26β), описывающие первичную спиртовую функцию, и сигнал одной двойной связи при δ 5.68 м.д. (1H, H-6). C-25 конфигурация была установлена как R, основываясь на разности химических сдвигов ($\Delta_{ab} = \delta_a$□$\delta_б$) геминальных протонов H_2□26 (Δ_{ab}=0.08 м.д.).

ЯМР ^{13}C спектр генина содержит сигналы для 27 атомов углерода, которые принадлежат трём метильным группам при δ (м.д.) 16.4 (C-18), 12.24 (C-21) и 17.7 (C-27), четырём кислород содержащим метиновым углеродам при δ (м.д.) 74.3 (C-22), 63.0 (C-19), 76.2 (C-3) и 70.6 (C-26), трём четвертичным углеродам при δ (м.д.) 43.2 (C-10), 41.7 (C-12) и 137.9 (C-5), семи метиновым углеродам при δ (м.д.) 34.4 (C-8), 36.9 (C-25), 41.5 (C-20), 52.1 (C-9), 53.8 (C-17), 22.9 (C-11) и 126.8 (C-6), и десяти метиленовым углеродам при δ (м.д.) 24.9 (C-15), 29.9 (C-16), 30.2 (C-2), 30.9 (C-24), 39.8 (C-4), 33.1 (C-7), 33.0 (C-23), 34.7 (C-1), 43.8 (C-13) и 59.0 (C-14). Спектральные данные ЯМР ^{1}H и ^{13}C определяют холестановый скелет агликона, и на основании HSQC и HMBC корреляций он отнесён к стероидным соединениям ряда холестана со следующей структурой: (25R)-холест-5-ен-3β,19β,22β,26-тетраол. Данный генин, названный нами флоридагенином, является новым ранее неописанным в литературе соединением.

По данным ЯМР спектроскопии **1** является биозидом, а **2** - триозидом. Действительно, в спектре ^{1}H ЯМР в области 4.8 – 6.5 м.д. имеются сигналы двух аномерных протонов для **1** и трёх аномерных протонов для **2** (характерное дублетное расщепление). Сигналы с химическими сдвигами δ 5.26 м.д. для **1** и 5.26 и 4.87 м.д. для **2** на основе малой величины константы спин-спинового взаимодействия (КССВ) ($J_{1,2}$=1.5–1.6 Гц) отнесены к аномерным протонам одного (для **1**) и двух (для **2**) остатков рамноз и определяют их α-конфигурацию. Сигналы аномерных протонов с химическими сдвигами 3.27–4.56 м.д. и большой величиной КССВ принадлежат остатку глюкозы и определяют β-конфигурацию её гликозидной связи. Типы гликозидных связей в углеводной части каждого гликозида следуют из двумерного эксперимента ROESY (ядерный эффект Оверхаузера во вращающейся системе координат). Так, в ROESY спектре **1** и **2** имеются ключевые кросс-пики с δ (м.д) 4.56 и 3.57, доказывающие пространственное сближение протонов H-1 глюкозы и H-3 агликона и однозначно определяющие моносахарид, связанный с агликоном, при δ (м.д.) 5.26 и 3.43, доказывающие связь остатка рамнозы с C-2 OH группой остатка глюкозы в **1**, а во **2** – ещё и при δ (м.д.) 4.87 и 3.55, подтверждающий 1→4 связь между другим остатком рамнозы и глюкозой, связанной с агликоном.

На основании полученных данных флориданозид B является 3-O-α-L-рамнопиранозил(1→2)-β-D-глюкопиранозид-(25R)-холест-5-ен,3β,19β,22β,26-тетраол, и флориданозид C □ 3-O-{[α-L-рамнопиранозил (1→4)]-[α-L-рамнопиранозил(1→2)]-β-D-глюкопиранозид}-(25R)-холест-5-ен,3β,19β,22β,26-тетраол.

Оба гликозида являются новыми ранее неописанными в литературе соединениями.

Литература:

1. *Ray AB, Gupta M.* In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Eds.; Springer Verlag: New York, NY, USA (**1994**) **63**, pp. 1 – 106.
2. *Misico RI, Song LL, Veleiro AS, Cirigliano AM, Tettamanzi MC, Burton G, Bonetto GM, Nicotra VE, Silva GL, Gil RR, Oberti JC, Kinghorn AD, Pezzuto JM.* Induction of Quinone Reductase by Withanolides. *J.Nat.Prod*., (**2002**) **65**, pp. 677 – 680.

NEW STEROIDAL GLYCOSIDES OF CHOLESTANE SERIES FROM THE SEEDS OF *PHYSALIS FLORIDANA RYDB.* THE STRUCTURE OF FLORIDANOSIDES *B* AND *C*

Shvets S.A., Kintya P.K., Marchenko A.A.

The Institute of Genetics and Plant Physiology, Academy of Sciences of Moldova, Chishinau, Moldova
e-mail: lexmarcenco@mail.ru

The genus *Physalis* (fam. *Solanaceae*) is known as a source of withasteroids [1], mainly withanolides and physalins. Many of these compounds show anti-inflammatory, antitumor, hepatoprotective, immunomodulatory and cytotoxic activities [1, 2].

In our studies we elucidated the chemical structures of steroidal glycosides cholestane series from the seeds *Physalis floridana Rydb*. By gel filtration on Sephadex and adsorption-partition chromatography on silica gel, from the sum of glycosides obtained from the methanol extract, individual glycosides, named by us floridanoside B (**1**) and C (**2**) were isolated

Each of floridanosides was subjected to complete acid hydrolysis, which resulted in the isolated aglycone with b.p. 198 – 199°C, $[\alpha]_{20}^{D}$ □89.7°, (c 0.4, $CHCl_3$), IR spectra: λ_{max}: 3450, 2970, 1635, 1255, 1160, 1030 cm^{-1}. The ESI-MS mass spectrum showed a major ion peak at *m/z* 435 $[M + H]^+$. Therefore, its molecular formula is represented by $C_{27}H_{46}O_4$, which was confirmed by HR-MALDI-MS.

In the result of acid hydrolysis in the oligosaccharide part of each glycoside by TLC in the presence of authentic samples glucose and rhamnose were identified.

The ^{1}H NMR spectrum of aglycone showed signals for three methyl groups at δ 0.94 ppm (3H, s, Me-18), 0.8 ppm (3H, d, J=7.1 Hz, Me-21) and 1.28 ppm (3H, d, J=6.0 Hz, Me-27), two methine proton signals at δ 3.67 ppm (1H, m, H-3) and 3.65 ppm (1H, m, H-22) indicative of secondary alcoholic functions and one double bond at δ 5.68 ppm (1H, H-6), four methylene proton signals at δ ppm 3.58 (1H, m, H-19α), 3.88 ppm (1H, m, H-19β), 3.42 ppm (1H, m, H-26α) and 3.79 (1H, m, H-26β), ascribable to a primary alcoholic function. The C-25 configuration was deduced to be R based on the difference of chemical shifts ($\Delta_{ab}=\delta_a$□δ_b) of the geminal protons H_2-26 (Δ_{ab}=0.08 ppm).

^{13}C NMR spectrum of aglycone displayed signals for 27 carbon atoms, which are clearly intended signals for three methyl groups at δ (ppm) 16.4 (C-18), 12.24 (C-21) and 17.7 (C-27), four oxygen bearing methine carbons at δ (ppm) 74.3 (C-22), 63.0 (C-19), 76.2 (C-3) and 70.6 (C-26), three quaternary carbons at δ (ppm) 43.2 (C-10), 41.7 (C-12) and 137.9 (C-5), seven methine carbons at δ (ppm) 34.4 (C-8), 36.9 (C-25), 41.5 (C-20), 52.1 (C-9), 53.8 (C-17), 22.9 (C-11) and 126.8 (C-6), and ten methylene carbons at δ (ppm) 24.9 (C-15), 29.9 (C-16), 30.2 (C-2), 30.9 (C-24), 39.8 (C-4), 33.1 (C-7), 33.0 (C-23), 34.7 (C-1), 43.8 (C-13) and 59.0 (C-14). Spectral data of 1H and 13C NMR analysis define the cholestane skeleton of the aglycone and on the basis of HSQC and HMBC correlations, it referred to the steroid compounds of the cholestane series with the following structure: (25R)-cholest-5-en-3β,19β,22β,26-tetraol. This genin, named by us floridagenin, is a new previously undescribed in the literature compound.

According to NMR spectroscopy floridanoside B is a bioside, and floridanoside C □ trioside. Indeed, in the ^{1}H NMR spectrum in the range 4.8 – 6.5 ppm there are signals of two anomeric protons for **1** and three anomeric protons for **2** (the characteristic doublet splitting). Signals with chemical shifts δ (ppm) 5.26 for **1** and 5.26 and 4.87 for **2** based on the small value of constant of the spin-spin interaction (CSSI) ($J_{1,2}$=1.5–1.6 Hz) refer to the anomeric proton of one rhamnose unit for **1** and two rhamnose residues for **2** and define their α-configuration. Anomeric proton signals with chemical shifts 3.27–4.56 ppm and a high value CSSI belong to glucose residues and define β-configuration of its glycoside bond. Types of glycoside bonds in the carbohydrate part of each glycoside were established by a two-dimensional experiment ROESY (nuclear Overhauser effect in the rotating coordinate system). Thus, in the ROESY spectrum of **1** and **2**, there are key cross-peaks at δ (ppm) 4.56 and 3.57 proving the spatial convergence of protons H-1 of glucose and H-3 of aglycone and uniquely determine the monosaccharide linked to the aglycone, at δ (ppm) 5.26 and 3.43, proving the linkage of rhamnose with C-2 OH group of glucose residues in **1**, and in **2** □ at δ (ppm) 4.87 and 3.55, confirming the 1→4 bond between other residue of rhamnose and glucose, linked to genin.

Based on these data floridanoside B is 3-O-α-L-ramnopyranosyl(1→2)-β-D-glucopyranoside-(25R)-cholest-5-en,3β,19β,22β,26-tetraol, and floridanoside C □ 3-O-{[α-L-ramnopyranosyl(1→4)]-[α-L-ramnopyranosyl(1→2)]-β-D-glucopyranoside}-(25R)-cholest-5-en,3β,19β,22β,26-tetraol.

Both glycosides are new previously unspecified in the literature compounds.

References:

1. *Ray AB, Gupta M.* In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Eds.; Springer Verlag: New York, NY, USA (1994) 63, pp. 1 – 106.
2. *Misico RI, Song LL, Veleiro AS, Cirigliano AM, Tettamanzi MC, Burton G, Bonetto GM, Nicotra VE, Silva GL, Gil RR, Oberti JC, Kinghorn AD, Pezzuto JM.* Induction of Quinone Reductase by Withanolides. *J.Nat.Prod*., (2002) 65, pp. 677 – 680.

МАРКЕР-АССОЦИИРОВАННАЯ СЕЛЕКЦИЯ В СОЗДАНИИ СОРТОВ ЛЬНА МАСЛИЧНОГО – СЫРЬЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ А-ЛИНОЛЕНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЛИГНАНОВ

[1]Вакула С.И., [1]Анисимова Н.В., [2]Феськова Е.В., [2]Леонтьев В.Н.

[1]ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
e-mail: N.Anisimova@igc.bas-net.by
[2]УО «Белорусский государственный технологический университет», Минск, Беларусь

Нутрицевтические свойства льняного семени обусловлены такими биологически активными компонентами как диетическая клетчатка, α-линоленовая кислота (АЛК) и лигнаны. АЛК и другие длинноцепочечные ω-3 жирные кислоты широко используются для профилактики хронических воспалительных заболеваний (инсульт, рак, волчанка и ревматический артрит) [1]. Лигнаны относятся к классу фитоэстрогенов, кроме контроля гормонального статуса организма, это потенциальные антиканцерогены, особенно эффективные при гормонзависимых формах рака (рак груди, простаты и эндометрия матки) [2]. Выявление источников генетической изменчивости и разработка методов модификации состава льняного семени даст возможность создавать сорта льна нутрицевтического назначения, оптимизировать переработку семян для получения биологически активных препаратов. Использование молекулярных маркеров к генам биосинтеза жирных кислот и лигнанов позволит сократить сроки селекционного процесса, а также направлено создавать сорта льна с заданным биохимическим составом семени.

Проведен анализ уровня АЛК и лигнанов в семенах коллекции 27 сортов и селекционных линий льна масличного. Выявлены образцы с высоким и низким уровнем АЛК в масле. Типирование с использованием молекулярных маркеров [3] позволило выделить генотипы-носители диких и мутантных аллелей генов *Fad3* десатураз, ассоциированных с уровнем АЛК в семени. Получены гибриды 3-х генераций, сочетающие гены высоко- и низколиноленовых родителей. Проведен жирнокислотный анализ семян поколения F_2, результаты представлены в таблице. Дальнейший селекционный процесс позволит создать линии льна масличного с оптимальным соотношением АЛК и лигнанов в семени для получения биологически активной добавки с антиаллергенной активностью.

Содержание жирных кислот в гибридных семенах льна масличного

№	Сорт/ гибрид	Содержание жирной кислоты в %					Йодное число
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	
1	Gold Flax	6,4	3,9	14,7	72,2	1,6	135,2
2	Amon	6,9	3,4	17,4	69,8	2,4	133,6
3	Ручеек	6,9	5,1	21,4	12,2	51,6	177,8
4	Lirina	6,6	5,2	23,6	12,3	50,3	176,2
5	Omega	5,5	4,6	20,0	16,3	45,0	170,5
6	Lirina×Amon 1	6,1	13,3	32,0	8,2	31,5	129,9
7	Lirina×Amon 2	5,8	17,1	31,8	6,3	28,7	118,5
8	Lirina×Amon 3	6,2	20,2	25,1	8,3	29,9	119,2
9	Amon× Lirina 1	6,6	16,2	37,5	10,0	18,3	102,0
10	Amon×Lirina 2	6,4	5,8	24,4	7,6	36,4	135,3
11	Amon×Lirina 3	6,4	15,2	29,2	10,1	27,7	120,5
12	Ручеек×Amon 1	6,6	16,4	28,5	10,1	26,2	115,6
13	Ручеек×Amon 2	6,6	15,6	29,5	10,1	26,1	116,3
14	Ручеек×Amon 3	6,4	17,5	28,2	10,7	24,1	110,7
15	Amon×Ручеек 1	6,4	4,2	17,0	5,1	46,9	153,0
16	Amon×Ручеек 2	5,7	4,9	18,3	4,7	44,0	145,3
17	Amon×Ручеек 3	6,3	13,8	26,1	6,9	38,1	140,2
18	Omega×Amon 1	6,2	14,8	28,4	9,7	31,7	130,0
19	Omega×Amon 2	5,8	4,4	14,7	4,6	49,7	157,6
20	Omega×Amon 3	7,0	13,0	40,6	7,7	21,9	110,5
21	Flanders×Amon 1	5,9	12,4	36,5	7,4	28,8	124,8
22	Flanders×Amon 2	6,0	12,0	24,9	10,9	35,8	140,2
23	Flanders×Amon 3	5,7	5,5	31,9	6,8	33,4	132,4

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БРФИ (Б09-113) и задания №17/2010–ИФП/3/02-2 «Разработать технологию комплексной переработки семян льна с получением фитопрепарата с антиаллергенной активностью на основе льняного масла и лигнанов».

Литература:

1.*B.D. Oomah* // Flaxseed as a functional food source - J. Sci. Food Agric., 2001, Vol. 81, N8, p. 889-894
2.*L.U. Thompson* // Flaxseed, lignans, and cancer - Flaxseed in H. Nutr., Champaign, IL., AOSC Press., 1995, p. 194-222
3.*P. Vrinten et al.* // Two *Fad*3 desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed - Plant Physiol., 2005, Vol. 139, N1, p. 79–87.

ВЛИЯНИЕ СВЕРХНИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АЦЕТИЛСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ СОЛЕЙ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ

Катюшина О.В., Хусаинов Д.Р., Коренюк И.И., Гамма Т.В., Черетаев И.В., Колотилова О.И.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина

В последнее время многие исследователи обращаются к изучению действия сверхнизких концентраций (СНК) биологически активных веществ, применение которых характеризуется отсутствием у них побочных эффектов при сохранении терапевтической активности. При этом известно, что СНК многих препаратов сохраняют полезные фармакологические свойства, характерные для более высоких концентраций. Так у ацетилсалициловой кислоты (аспирина – Asp) наряду с ее широким спектром действия были обнаружены и нейротропные эффекты в концентрациях 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} М. В концентрации10^{-2} М отмечено токсическое действие Asp. Поэтому целью настоящего исследования было определение наличия и направленности нейротропного действия Asp и его солей: ацетилсалицилата кобальта (АСК) и цинка (АСЦ) в диапазоне сверхнизких концентрациях (СНК) 10^{-11}-10^{-17} М. С помощью стандартной методики внутриклеточного отведения биопотенциалов на идентифицированных и неидентифицированных нейронах подглоточного комплекса ганглиев виноградной улитки *Helix albescens* Rossm. изучали пространственно-временных характеристики электрических потенциалов нейронов.

Определены пики активности данных агентов - 10^{-12}, 10^{-14}, 10^{-17} М. Показано, что действие Asp в СНК проявляется в модулировании мономодальной ритмической активности нейрона в медленную пачечную активность. При этом Asp в СНК достоверно снижал амплитуду, частоту и длительность потенциалов действия (ПД), а также скорость нарастания трансмембранных ионных токов на фоне гиперполяризации мембранного потенциала. Обнаруженные эффекты Asp в СНК повторяют эффекты больших концентраций (10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} М), однако угнетающий эффект при действии СНК менее выражен на фоне модулирующего действия Asp. Это подтверждает тот факт, что после отмывания у нейронов восстанавливались фоновые показатели электрической активности. В отличие от Asp его соли, напротив, оказывали активационно-модулирующее действие на импульсную активность нейронов улитки, что характеризовалось появлением у нейронов медленноволновой пачечной активности. Активационный эффект АСК в концентрации 10^{-12} М выражался в увеличении амплитуды, длительности ПД и скорости нарастания входящих ионных токов при небольшой гиперполяризации МП, а в концентрации 10^{-14} и 10^{-17} М наблюдалось увеличение частоты ПД. У АСЦ в СНК 10^{-12} и 10^{-17} М увеличивалась скорость входящих ионных токов, а в концентрации 10^{-14} М отмечены деполяризация МП, увеличение в три раза частоты генерации и уменьшении длительности ПД по сравнению с фоном, У фоновонеактивных нейронов ВГ АСЦ в концентрации 10^{-14} М инициировал импульсную активность, что характеризует его как инициатор электрической активности. Необходимо отметить, что эффекты АСК были менее выражены, чем у АСЦ. Механизм нейротропного действия Asp и его солей обсуждается.

В целом, анализ результатов проведенного исследования показал эффективность применения СНК Asp и его солей, при которой наблюдалась меньшая токсичность по сравнению с терапевтическими концентрациями (10^{-2}, 10^{-3} М).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРО- И УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ТРИПТОФАНА

Семенкевич Н.Г., Бильдюкевич А.В., Фенько Л.А., Семенкевич В.Н., Жаркевич И.Л.

Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: fenko.ludmila@gmail.com

Новые прогрессивные технологии получения очищенных аминокислот из продуктов микробиологического синтеза, основанные на ионообменно-экстракционном выделении целевого продукта, занимают все более значительное место в арсенале промышленных технологических процессов [1-3]. Основными достоинствами экстракционных методов являются высокая эффективность проведения процесса и возможность его оформления в непрерывном режиме. Однако для успешного применения ионообменной экстракции требуется высокая степень очистки нативных растворов. В качестве быстрого, простого и недорого метода концентрирования и очистки культуральной среды при выделении триптофана – незаменимой аминокислоты с обширным спектром действия - нами предложена микро- и ультрафильтрация.

В работе представлены экспериментальные данные по исследованию процесса микро- и ультрафильтрации нативных растворов триптофана с целью обеспечения более глубокой степени очистки, удовлетворяющей требованиям их дальнейшей переработки методами ионообменной экстракции.

Производственные испытания процесса ультрафильтрации нативных растворов, содержащих триптофан, проведены на базе предприятия «Биовет АД» (Болгария) с использованием рулонных мембранных элементов на основе ультрафильтрационных (УФ) мембран ПАН-100, изготовленных в ИФОХ НАН Беларуси. Установлено, что удельная производительность УФ-мембран определяется качеством предварительной обработки культуральной жидкости. При использовании для отделения биомассы коагуляции с последующей фильтрацией на барабанных фильтрах, средняя удельная производительность УФ-мембран при степени концентрирования 18 составила 30-45 л/м^{2}ч. Значительного увеличения производительности ультрафильтрации удалось достичь при использовании на стадии предподготовки микрофильтрации культуральной жидкости на трубчатых керамических мембранах с размером пор 0,2 мкм. Применение микрофильтрации позволило увеличить удельную производительность УФ-мембран до 67-90 л/м^{2}ч.

В период испытаний на ультрафильтрационной установке фирмы «Koch membrane system», включающей шесть рулонных элементов диаметром 210 мм и длиной 940 мм с общей эффективной площадью фильтрации 84 м^2, переработано 16 922 м^3 нативного раствора с концентрацией триптофана 10,3-18 г/л. Степень концентрирования составила 18-20, потери целевого продукта с концентратом не превышали 3%. При этом степень очистки нативных растворов была очень высокой, что позволило для выделения триптофана на последующих стадиях эффективно использовать ионообменную экстракцию.

Литература:

1. *Г.И. Кузнецов, А.В. Косогоров, З.И. Куваева, А.А. Пушков, А. В. Микулич* // Применение центробежных экстракторов ЦЭНТРЭК в производстве аминокислот. – III Международная конференция «Экстракция органических соединений» ЭОС-2005 - Воронеж, Россия, 17-21.10.2005, с. 126.
2. *Е. Г. Каранкевич, З. И. Куваева, А. В. Микулич* // Экстракция L-пролина ди-(2-этилгексил)-фосфорной кислотой. – Извести НАН Беларуси. – 2009, № 4, С. 45-49.
3. *G.I. Kuznetsov, A.V. Kosogorov, A.A. Pushkov, Z.I. Kuvaeva, A.V. Mikulich* // Centrifugal Extractors in Biotechnology and Pharmaceutics. – Proceedings of ISEC2008 International Solvent Extraction Conference Solvent Extraction: Fundamentals to Industrial Applications. – 2008, V. 2, P. 985-990.

КАСКАДНАЯ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИЯ В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ПРЕПАРАТА ДИАВИТОЛ

Семенкевич Н.Г., Фенько Л.А., Семенкевич В.Н., Жаркевич И.Л., Бильдюкевич А.В.

Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: fenko.ludmila@gmail.com

Процессы выделения и очистки различных веществ с использованием селективно проницаемых мембран отличаются относительной простотой аппаратурного оформления и небольшими энергозатратами. Являясь мягким методом разделения, мембранная фильтрация позволяет в максимальной степени сохранить основные свойства целевого продукта, что особенно важно при выделении биологически активных веществ, в частности, препарата диавитол, который представляет собой депротеинизированный экстракт крови эмбрионов коров или крови телят в возрасте до 3-х месяцев.

Указанный препарат обладает широким спектром фармакологической активности, оказывает антигипоксическое, противовирусное, иммудомодулирующее, ранозаживляющее действие и применяется в офтальмологии, гастроэнтерологии, хирургии, неврологии [1-3]. Мультимодальный эффект диавитола связан с содержанием низкомолекулярных пептидов, аминокислот, промежуточных продуктов углеводного и липидного обмена, гликолипидов, нуклеозидов, микроэлементов и других компонентов, оказывающих полифункциональное воздействие.

В рамках разработки современной, эффективной и экономически выгодной технологии получении субстанции препарата диавитол для разделения компонентов крови было предложено использовать ультрафильтрацию. Целью данной работы являлось определение оптимального мембранного материала для получения субстанции препарата диавитол. В работе были использованы плоские мембраны из полисульфона и полиакрилонитрила с различным номинальным молекулярно-массовым пределом задержания марок ПС-50, ПС-100, ПАН-5М, ПАН-10, ПАН-50, ПАН-100 (ТУ BY 100185198.091-2008) производства ИФОХ НАН Беларуси.

Оптимальный выбор мембран для ультрафильтрации предполагает максимальную производительность при удовлетворительной селективности процесса разделения. Кроме того, в процессе эксплуатации мембраны должны как можно меньше засоряться и легко регенерироваться [4]. Проведенные лабораторные испытания показали, что оптимальным условиям процесса разделения компонентов крови отвечает проведение каскадной ультрафильтрации с использованием на первой стадии мембраны ПАН-50, а на второй стадии - модифицированной мембраны ПАН-5М.

Производственные испытания процесса разделения крови, проведенные на базе предприятия "Диалек" с использованием изготовленных в ИФОХ НАН Беларуси рулонных мембранных элементов из мембран ПАН-50 и ПАН-5М, показали высокую эффективность процесса ультрафильтрации. Средняя скорость фильтрации крови на первой стадии составила 7 л/м^{2}ч, на второй - 5,6 л/м^{2}ч, с выходом активной субстанции 60-65%. Контроль полученной субстанции в О Т К предприятия Диалек показал, что фильтрат соответствует требованиям ФС РБ 007-06 во всех проведенных испытаниях.

Проведена промышленная адаптация технологии. Использование двухстадийной схемы ультрафильтрации позволило существенно ускорить процедуру отделения веществ и таким образом сократить длительность технологического процесса при получении препарата диавитол.

Литература:

1. *Л.Н. Марченко* // Применение диавитола при заболеваниях сетчатки и зрительного нерва - Труды молодых ученых, 2001, с. 238-242.
2. *А.С. Федулов, Н.И. Мезен, З.Б Квачева* // Механизмы нейропротекторного действия диавитола в условиях гипоксии - Рецепт. – 2000, № 4, с. 117-124.
3. *С.А. Лихачёв, И.А. Гончар, Г.К. Недзьведь* // Базисная терапия ишемического инсульта у больных с артериальной гипертензией - Медицинские новости. – 2006, № 7, с. 37-41.
4. *N. Ozaki, K. Yamamoto* // Hydraulic effects on sludge accumulation on membrane surface in crossflow filtration- Water Res., 2001, Vol. 35, p. 137-3146.

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК ДЕЯКИХ ВИДІВ РОДИНИ *LAMIACEAE JUSS*

Шанайда М.І.

Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського, Тернопіль, Україна
e-mail: shanayda@rambler.ru

Флавоноїди – найбільш поширені в рослинному світі сполуки, в основі структури яких лежить дифенілпропановий фрагмент. Однією з найважливіших особливостей флавоноїдів є їхня антиоксидантна активність. Фенольна структура надає можливість молекулі взаємодіяти з вільними радикалами, зменшуючи інтенсивність перекисного окислення ліпідів. Однією із широко розповсюджених у природі фенолоксилот є кофейна, яка виявляє протизапальну, гепатопротекторну, імунотропну дію.

Метою наших досліджень було порівняльне вивчення вмісту флавоноїдів та фенолокислот у надземній частині неофіцинальних лікарських рослин родини *Lamiaceae* – *Monarda fistulosa* L. і *Lophanthus anisatus* Adans. Оскільки основна увага науковців сконцентрована на вивченні ефіроолійного складу цих рослин [1], аналізу фенольних сполук практично не приділяється уваги [2].

Вміст фенолокислот і флавоноїдів у сировині досліджуваних рослин, які вирощували в умовах Тернопільської області, визначали методом високоефективної рідинної хроматографії на хроматографі Agilent Technologies 1100. Елюювання проводили 0,4 %-м водним розчином трифтороцтової кислоти та метанолом.

На основі проведеного ВЕРХ-аналізу екстрактів досліджуваних рослин виявлено 14 похідних флавону (табл. 1), з яких 7 не ідентифіковано. Як видно з таблиці 1, похідні апігеніну виявили більшу різноманітність якісного складу, ніж похідні лютеоліну, що узгоджується з літературними даними стосовно інших представників родини *Lamiaceae* [3].

Таблиця 1. Вміст флавоноїдів у надземній частині *Monarda fistulosa* і *Lophanthus anisatus*

Флавонова сполука	Час утримання, хв	*Monarda fistulosa* (мг/кг)	*Lophanthus anisatus*(мг/кг)
1 лютеоліну диглікозид	25,7	420	335
2* похідне лютеоліну	26,15	390	-
3 апігеніну диглікозид	28,28	8152	351
4 лютеоліну моноглікозид	29,5	-	948
5* похідне апігеніну	30,3	655	-
6 апігеніну моноглікозид	32,7	3169	-
7 лютеоліну аглікон	32,8	-	466
8 апігеніну моноглікозид	33,7	-	8867
9 апігеніну моноглікозид	34,5	-	934
10* похідне апігеніну	34,75	164	537
11* похідне апігеніну	35,12	71	-
12* похідне апігеніну	36,01	-	4930
13* похідне апігеніну	36.38	-	1700
14* похідне апігеніну	36,80	-	280

Примітка: *- позначено неідентифіковані сполуки.

У сировині обох досліджуваних видів виявлено ряд похідних кофейної кислоти (результати наведені в табл. 2). Як видно з табл. 2, в екстрактах трави обох видів домінує дикофеїл-3,4-хінна кислота.

Таблиця 2. Вміст фенолокислот у надземній частині *Monarda fistulosa* і *Lophanthus anisatus*

Назва фенолокислоти	*Monarda fistulosa* (мг/кг)	*Lophanthus anisatus* (мг/кг)
кофеїл-5-хінна	-	52,28
кофеїл-3-хінна (хлорогенова)	1120,29	1642,14
дикофеїл-3-5-хінна	516,84	-
дикофеїл-4,5-хінна	1980,78	-
дикофеїл-3,4-хінна кислота	15261,95	15900,81

Отримані результати можуть бути використані в хемотаксономії представників родів *Monarda* та *Lophanthus,* а також при подальшому дослідженні біологічної активності витягів із надземної частини рослин.

Література:

1. Эфирномасличные и пряноароматические растения / О.К. Либусь, В.Д. Работягов, С.П. Кутько, Л.А. Хлыпенко. – Херсон: Айлант, 2004. – 272 с.
2. *Шанайда М.І.* Ботаніко-фармакогностичні аспекти вивчення лікарських рослин родини Lamiaceae Juss. (ОГЛЯД) / *М.І. Шанайда* // Фітотерапія. Часопис. – 2005. – № 2. – С. 50–57.
3. *Patora J.* Flavonoids from lemon balm (Melissa officinalis L., Lamiaceae) / J. Patora, B. Klimek // Acta Pol. Pharm. – 2002. – 59(2). – P. 139-143.

NEW TECHNOLOGIES, BIOACTIVE NATURAL AND SUSTAINABLE DEVELOPMENT IN IRAN

[1]Seyed Mohammad Hosseini, [2]Seyed Wajihallah Mousavi

[1]Ministry of Sciences, Research and Technology, Iran
e-mail: S_hosseini99@yahoo.com
[2]Forest and Range Management, Chalous, Iran,
e-mail: W.mousavi@yahoo.com

According to the last General Statistical Data in Iran in 2010, the population is nearly 75 million which 68% are living in urban area and 32% in rural regions. In recent years, knowledge about ecosystem management and sustainable development and the future risks on synthetic products were increased with using mass media, newspapers, workshops and so on. Meanwhile, parallel with these strategies, due to world progresses on bioactivities, investigation on biomaterials in both natural and synthetic sections has been increased in Iran. In the first phase, the government decided to encourage people to investing in biomaterials by showing some sample plots in many parts of country, and then supported private sections to be active by finance supporting via bank systems with low rate interest. The bioactivities for energy consumption, medical products, and agriculture products in Iran comparing with last decade, were increased about 3%, 48% and 21% respectively.

In this paper, bioactivities on industrial products, medical sciences, energy and agricultural products and also their problems, solutions and strategies in Iran during last decade will be discussed.

Фундаментальные и прикладные аспекты получения биологически активных веществ: биотехнология

Fundamental and Applied Problems of Obtaining of Bioactive Substances: Biotechnology

Спонсор Конференции

BIO-RAD

BIO-RAD Laboratories

Обладнання і реагенти для дослідницьких, медичних та промислових лабораторій

Компанія BIO-RAD (США) є найбільшим світовим виробником лабораторного та аналітичного обладнання. На сьогодні BIO-RAD представляє широку гамму обладнання для дослідницьких та промислових лабораторій:

- **ПЛР-ампліфікатори CFX96 Real Time**
- **Обладнання та реагенти для геном них та протеомних досліджень**
- **Обладнання для рідинної хроматографії**
- **Обладнання, реагенти і витратні матеріали для електрофорезу та блоттінгу**
- **Системи анализу зображення. Документуючі системи. Програмне забеспечення**

За додатковою інформацією щодо технічних можливостей та вартості продукції компанії BIO-RAD просимо Вас звертатися до регіонального представництва компанії в Україні за адресою:

Київ, 02160, проспект Возз'єднання 7а, оф. 315
Тел.: (050) 446-21-13, (050) 448-34-56
e-mail: office@bio-rad.com.ua
www.bio-rad.com

МИКРОМИЦЕТЫ – ПРОДУЦЕНТЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

[1]Айзенберг В.Л., [1]Стойко В.И., [1]Курченко И.Н., [1]Сырчин С.А., [1]Страшный В.В., [2]Омельчук Е.А., [2]Борисенко А.В., [2]Красинько В.О., [2]Иванов А.А., [3]Супрун С.М.

[1]Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: v_stoiko@mail.ru
[2]Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина
[3]Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев, Украина

Изучение биологически активных метаболитов грибов – одно из приоритетных направлений биотехнологии. Отдел физиологии и систематики микромицетов ИМВ НАН Украины располагает целой серией микромицетов – продуцентов внеклеточных гидролаз: пектинэстеразы, липазы, инулиназы, целлюлаз, характеризующихся разнообразными аспектами применения.

Для каждой промышленной отрасли, использующей ферментные препараты, существует определенный набор необходимых требований. Так, характерным требованием, предъявляемым к ферментам для моющих средств, в частности, к липазам (удаление жировых и масляных загрязнений), являются их гидролитические свойства, способность проявлять активность при щелочных значениях pH и повышенных температурах. В отделе селекционирован эффективный продуцент экзолипазы – термотолерантный гриб *Rhizopus* sp. 2000 ФМ, отличающийся высокими гидролитическими свойствами и щелочестойкостью.

Отобран штамм – активный продуцент инулиназы *Penicillium aculeatum* 225, характеризующийся повышенной термостабильностью. Методом ультрафильтрации получен концентрат культуральной жидкости гриба с использованием полисульфоновой мембраны (cut off 30 кДа). Удельная активность препарата инулиназы составила 6,07 од/мг белка. Важный аспект применения грибной инулиназы – получение фруктоолигосахаридов для приготовления функциональной пищи и пробиотиков, фруктозы из топинамбура.

На данном этапе исследований проведен многоступенчатый скрининг среди коллекционных микромицетов с целью отбора штаммов, способных к биосинтезу целлюлаз. Выделены термотолерантные культуры грибов родов *Aspergillus, Corynascus, Thielavia*, синтезирующие эндоглюканазу (Cx -фермент) с высокой степенью снижения вязкости 0,3%-го раствора Na-КМЦ (от 40 до 52%), а также экзоглюканазу (C_1-фермент) с образованием на 4-ые сутки культивирования на средах с целлюлозосодержащими субстратами около 100 мкг/мл глюкозы и более.

Ряд штаммов грибов рода *Thielavia* с установленной целлюлозолитической активностью, может быть использованы для обогащения вторичного растительного сырья (отходов) белком (содержание протеина в культуре достигает 40-50%) и витаминами. Селекционированные штаммы продуцируют тиамин (до 30-40 мкг/г), никотиновую кислоту (до 800-1000 мкг/г), пантотеновую кислоту (до 600-800 мкг/г).

MICROMYCETES – THE PRODUCERS OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

[1]Aisenberg V.L., [1]Stoiko V.I., [1]Kurchenko I.N., [1]Syrchin S.A., [1]Strashny V.V., [2]Omelchuk E.A., [2]Borisenko A.V., [2]Krasinko V.O., [2]Ivanov A.A., [3]Suprun S.M.

[1]Institute of Microbiology and Virology, Ukrainian National Academy of Sciences, Kyiv, Ukraine
e-mail: v_stoiko@mail.ru
[2]National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine
[3]A.V. Palladin Institute of Biochemistry, Ukrainian National Academy of Sciences, Kyiv, Ukraine

The study of biologically active fungi metabolites is one of the main approaches of biotechnology.

The Department of Physiology and Systematics of Micromycetes of the Institute of Microbiology and Virology of Ukrainian National Academy of Sciences has a set of micromycetes - the producers of Extra-cellular hydrolases: pectinesterase, lipase, inulinase, cellulases, characterized by different aspects of utilization.

Every industrial branch using enzyme preparations has certain demands. Thus, washing means enzymes, lipase, in particularly, (fatty and oily soiling removal) should possess hydrolytic properties, the ability to alkali values of pH and high temperatures. The department has selected an effective producer of exolipase – thermotolerant fungus *Rhizopu*s sp. 2000 FM, distinguishing in high hydrolytic properties and alkali stability. It has been selected the enzyme – an active inulinase producer *Penicillium aculeatum* 225, characterized by a high thermostability. Ultrafiltration method allows a fungus cultural liquid concentrate by the utilization of polysulphone diaphragm (cut off 30 kDa).

Specific activity of the inulinase preparation is 6,07 un/mg. A main aspect of fungus inulinase utilization is the obtaining of fructooligosaccharides for functional food and fructose prebiotics preparation from Jerusalem artichoke inulinase.

A multi-stage screening among micromycetes collection has been made at the given stage of investigations to select strains able to cellular biosynthesis. There have been selected thermotolerant fungus of *Aspergillus, Corynascus, Thielavia* cultures synthesizing endogluconase (Cx-enzyme) with a high degree of viscosity reduction of 3% Na-KMC solution (40- 52%) and exoglucanase (C1-enzyme) with the generation of cultivation on media of cellulose contain substrates of about 100 mkg/ml and more glucose generating on the 4-th day.

Some fungus *Thielavia* strains with a stated cellulosolitic activity may be used to enrich the second plant raw materials (waste) by protein (40-50% in a culture) and vitamins. The selected strains produce thiamine (30-40 mkg/gr), nicotine acid (800-1000 mkg/gr), pantotane acid (60-800 mkg/gr).

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ТУМСТАТИНА (69-95) И ЭНДОСТАТИНА (1-49), ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КОМПЛЕКСНОЙ АНТИАНГИОГЕННОЙ ТЕРАПИИ

[1]Бейрахова К.А., [2]Лихванцева В.Г., [3]Степанова Е.В., [1]Есипов Р.С.

[1]Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия. e-mail: esipov@ibch.ru
[2]Учреждение РАН Центральная клиническая больница РАН, Москва, Россия
[3]Государственное учреждение Российский Онкологический Научный Центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва, Россия

Эндостатин и тумстатин, протеолитические фрагменты коллагенов VIII и IV типов соответственно, известны как эндогенные ингибиторы ангиогенеза. Тумстатин подавляет пролиферацию эндотелиальных клеток, связываясь с интегрином $\alpha_v\beta_3$. Эндостатин предотвращает миграцию эндотелиальных клеток, действуя через интегрин $\alpha_5\beta_1$, и таким образом ингибирует ангиогенез отличным от тумстатина путём. Комбинация этих двух препаратов может оказаться перспективной для подавления патологического ангиогенеза.

В задачи исследования входили разработка эффективных схем биотехнологического получения функционально активных фрагментов эндостатина (1-49) и тумстатина (69-95) и изучение их антиангиогенных свойств на моделях различных этапов патологической неоваскуляризации *in vitro* и *in vivo*.

Тумстатин (69-95) получали в бактериальных клетках *E. coli* в составе гибридного белка (ГБ) с тиоредоксином и специфическим сайтом для расщепления протеазой вируса гравировки табака (TEV протеазой). ГБ очищали с помощью ионообменной хроматографии и расщепляли TEV протеазой. Тумстатин (69-95) отделяли от тиоредоксина с помощью ультрафильтрации.

ГБ, содержащий эндостатин (1-49) и интеин *Ssp*DnaB, синтезировался в бактериальных клетках *E. coli* в виде телец включения. ГБ солюбилизировали и подвергали автокаталитическому расщеплению с образованием свободного фрагмента эндостатина (1-49). Целевой пептид отделяли от интеина с помощью тангенциальной ультрафильтрации.

Финальную очистку тумстатина (69-95) и эндостатина (1-49) проводили с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Антиангиогенная активность полученных пептидов была изучена *in vitro* с использованием культуры эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10. В тесте на антипролиферативное действие тумстатин (69-95) в дозе 20 нМ подавлял пролиферацию эндотелиальных клеток на 65%. Эндостатин (1-49) не обладал антипролиферативным эффектом. Исследование способности пептидов ингибировать образование трубочкоподобных структур эндотелиальными клетками показало, что оба пептида активны в дозе 10 нМ.

На экспериментальной модели неоваскуляризации роговицы кролика была показана способность полученных рекомбинантных пептидов блокировать начальные этапы ангиогенеза при единовременном введении с индукторами ангиогенеза. При введении препаратов через 3 недели после индукции ангиогенеза клинически значимый аваскулогенный эффект на сформированную сеть сосудов показал только тумстатин (69-95). Таким образом, по результатам наших исследований, тумстатин (69-95) продемонстрировал более высокую антиангиогенную активность, чем эндостатин (1-49). Предполагается изучение эффектов совместного использования полученных пептидов для оценки их синергетического действия и потенциала применения этих препаратов для комплексной терапии заболеваний, протекающих с патологической неоваскуляризацией.

BIOTECHNOLOGICAL SYNTHESIS OF TUMSTATIN (69-95) AND ENDOSTATIN (1-49), DRUG CANDIDATES FOR COMBINATION ANTIANGIOGENIC THERAPY

[1]Beyrakhova K.A., [2]Likhvantseva V.G., [3]Stepanova E.V., [1]Esipov R.S.

[1]Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
e-mail: esipov@ibch.ru
[2]Central Clinical Hospital, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
[3]N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Endostatin and tumstatin, proteolytic fragments of collagens VIII and IV, respectively, are endogenous inhibitors of angiogenesis. Tumstatin suppresses proliferation of endothelial cells binding to integrin $\alpha_v\beta_3$. Endostatin prevents the migration of endothelial cells via integrin $\alpha_5\beta_1$, and thus inhibits angiogenesis in a different way. A combination of the two compounds could be a promising treatment to suppress pathological angiogenesis.

The aims of our research included development of efficient schemes for biotechnological production of active fragments of endostatin (1 – 49) and tumstatin (69 – 95) and investigation of their antiangiogenic properties using *in vitro* and *in vivo* models of different stages of pathological neovascularization.

Tumstatin (69 – 95) was obtained in bacterial E. coli cells as part of a fusion protein (FP) with thioredoxin and a specific recognition site of Tobacco etch virus protease (TEV protease). FP was isolated using ion-exchange chromatography and cleaved with TEV protease. Tumstatin (69 – 95) was separated from thioredoxin using ultrafiltration.

FP, containing endostatin (1 – 49) and intein *Ssp*DnaB, was synthesized in bacterial E. coli cells in the form of inclusion bodies. FP was solubilized and subjected to autocatalytic cleavage resulting in endostatin (1-49) release. The target peptide was separated from intein using tangential ultrafiltration.

The final purification of tumstatin (69 – 95) and endostatin (1 – 49) was performed by reversed-phase HPLC.

The antiangiogenic activity of the obtained peptides was studied *in vitro* using murine endothelial cells SVEC-4-10. In the antiproliferation assay tumstatin (69 – 95) at a concentration of 20 nM suppressed the proliferation of endothelial cells by 65%. Endostatin (1 - 49) did not produce an antiproliferative effect on the cells. The investigation of the peptides' ability to inhibit endothelial cell tube formation revealed that both peptides were active in the dose of 10 nM.

The ability of the recombinant peptides to block the initial stages of angiogenesis was demonstrated on the model of rabbit corneal neovascularization. In this model each peptide was added simultaneously with the induction of angiogenesis. In another model, in which the drugs were injected 3 weeks after the angiogenesis induction, only tumstatin (69 – 95) exhibited clinically relevant reduction of preformed vessels. Therefore, according to our research data, tumstatin (69 – 95) demonstrated a higher antiangiogenic activity, than endostatin (1 – 49). The investigation of the combined use of tumstatin (69 – 95) and endostatin (1 – 49) will be carried out in order to evaluate their synergetic effect and their potential as drugs for combination therapy of neovascular diseases.

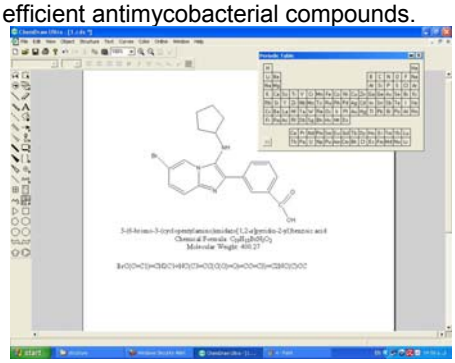
CONSTRUCTING ANTI-MYCOBACTERIUM COMPOUND DATABASE TOWARDS PROGRESSING ANTIMICROBIAL DRUG DISCOVERY

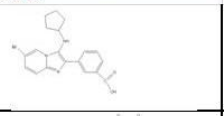
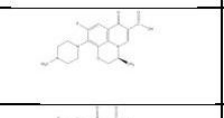
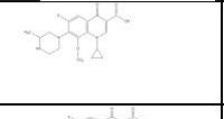
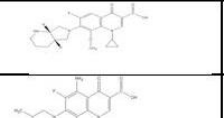
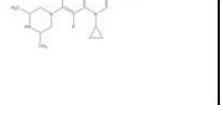
[1, 2]Ghazaleh Ghavami, [1, 2]Soroush Sardari

[1]Department of Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[2]Eastern Mediterranean Health Genomics and Biotechnology Network (EMGEN), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

e-mail: ssardari@hotmail.com

Mycobacterium tuberculosis is causative agent of tuberculosis disease which is an obligate aerobe bacterium. Because of some reasons such as long treatment period, high toxicity, resistance development and many others, there is a need to new look at the issue. To design novel compounds against *Mycobacterium sp.*, the database contained 400 antimycobacterial compounds has been made. The database generally contains the following interfaces: (IUPAC Name, Common Name, SMILES, Chemical Formula, MW, MIC, Strain Specification and Structure). Data generated from performed researches via 400 compounds showed that the main cellular mechanisms involved in their antimycobacterial aactions are; inhibiting production of interferon gamma (IFN-γ), interleukin-5 (IL-5), glutamine synthetase, acetohydroxyacid synthase (AHAS), CYP3A4 and microsome stability, enoyl acyl carrier protein reductase, bacterial peptide deformylase (PDF), biosynthesis of fatty acid and glycoside, thymidine monophosphate kinase (TMPKmt), ribosome and mechanism related to nitro-bearing antibacterials, supercoiling activity of wild-type DNA gyrase, b-ketoacyl-ACP synthase, mtFabH enzyme, dihydrofolate reductase, siderophore biosynthesis, arabinogalactam and peptidoglycan biosynthesis, proton pump F0F1H+ATPase, lipid and mycolic acid synthesis, mycobacterial cytochrome P450 monooxygenases, nucleoside monophosphate kinase, proton pump F0F1H+ATPase, MenE, acyl-CoA synthetase involved in bacterial menaquinone biosynthesis, dTDP-rhamnose synthesis, alpha-glucosidase, mycothiol-*S*-conjugate amidase, acting as 1,1-dioxide analogues, targeting the 30S subunit of ribosome, interacting with enzymes in the mycobacterial electron transport chain, acting as structural analog of D-alanine, phosphonate and inhibitor of antigen 85C. The analysis of MIC (μM) via 400 antimycobacterial compounds has been classified as; 0.0000001 ≤ 10.5% < 0.001, 0.001 ≤ 16.5% < 0.01, 0.01 ≤ 22.75% < 0.1, 0.1 ≤ 13.25% < 1, 1 ≤ 16.25% < 10, 10 ≤ 13.75% < 100, 100 ≤ 6.75% < 1000 and 1000 ≤ 0.25% <2000. The constructed database with pointed information can play applied role in designing novel and efficient antimycobacterial compounds.



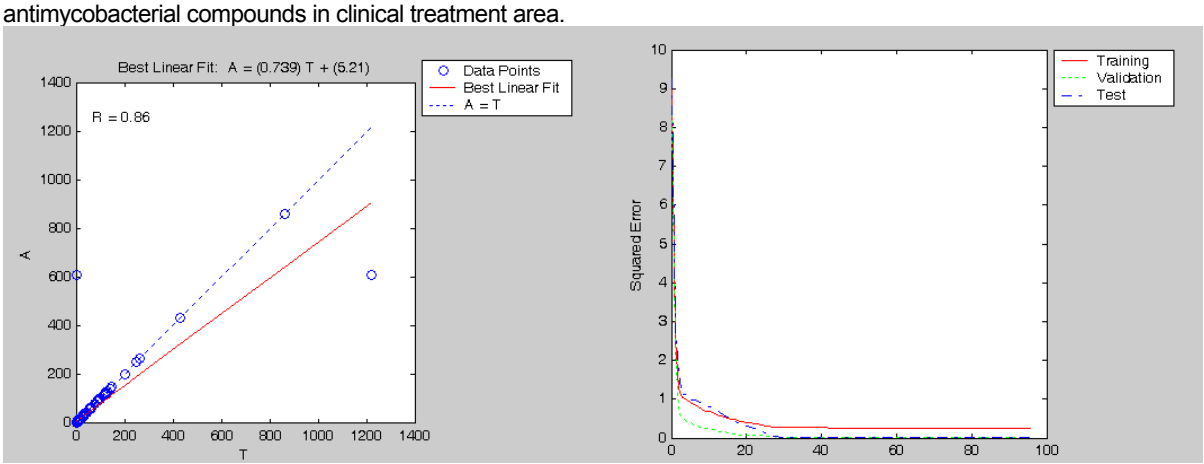
1	IUPAC Name	Common Name	SMILES	Chemical Formul	MW	MIC (μM)	Strain Specification	Structure	Ref.
2	3-(6-bromo-3-(cyclopentylamino)imidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)benzoic acid		BrC(C=C1)=CN2C1=NC(C3=CC(C(O)=O)=CC=C3)=C2NC4CCCC4	C19H18BrN3O2	400.27	0.76	*Mycobacterium tuberculosis*		Luke et al(2009)
3	(S)-9-fluoro-3-methyl-10-(4-methylpiperazin-1-yl)-7-oxo-3,7-dihydro-2H-[1,4]oxazino[2,3,4-ij]quinoline-6-carboxylic acid	levofloxacin	FC1=CC2=C(N3C=C(C(O)=O)C2=O)C(OC[C@@H]3C)=C1N4CCN(C)CC4	C18H20FN3O4	361.37	3.32 e-4	Mycobacterium tuberculosis (Sensitive)		Showalter et al (2008)
4	1-cyclopropyl-6-fluoro-8-methoxy-7-(3-methylpiperazin-1-yl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid	gatifloxacin	FC1=CC2=C(N(C3CC3)C=C(C(O)=O)C2=O)C(OC)=C1N4CC(C)NCC4	C19H22FN3O4	375.39	7.99 e-5	Mycobacterium tuberculosis (Sensitive)		Showalter et al (2008)
5	1-cyclopropyl-6-fluoro-8-methoxy-7-((4aS,7aS)-octahydropyrrolo[3,4-b]pyridin-6-yl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid	moxifloxacin	O=C(C1=CN(C2CC2)C3=C(C=C(F)C(N(C4)C[C@]5([H])[C@]4([H])CCCN5)=C3OC)C1=O)O	C21H24FN3O4	401.43	3.98 e-4	Mycobacterium tuberculosis (Sensitive)		Showalter et al (2008)
6	5-amino-1-cyclopropyl-7-(3,5-dimethylpiperazin-1-yl)-6,8-difluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid	sparfloxacin	NC1=C(F)C(N2CC(C)NC(C)C2)=C(F)C(N(C3CC3)C=C4C(O)=O)=C1C4=O	C19H22F2N4O3	392.4	1.52 e-4	Mycobacterium tuberculosis (Sensitive)		Showalter et al (2008)

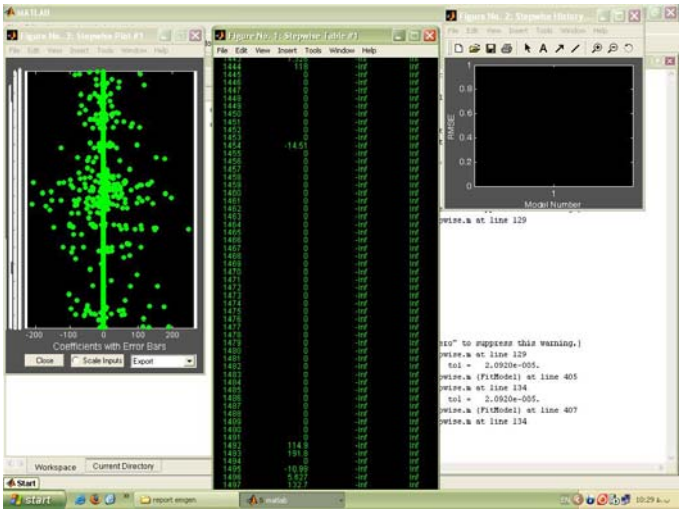
MODELING ANTIMYCOBACTERIAL COMPOUNDS TO DESIGN NOVEL COMPOUND TARGETS WITH PROBABLE MIC *IN SILICO*

[1 2]Ghazaleh Ghavami, [1,2]Soroush Sardari

[1]Department of Medical Biotechnology, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
[2]Eastern Mediterranean Health Genomics and Biotechnology Network (EMGEN), Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
e-mail: ssardari@hotmail.com

Tuberculosis has become a serious consideration due to cause of about 2 million deaths each year. It is predictable that 30% of the world population is at this time infected with the bacillus in its latent type and that virtually 9 million new cases expand each year. Consistent with WHO, multi-resistant tuberculosis is in charge of approximately 460 thousand recent cases per year and for about 740 thousand latest patients infected by both *Mycobacterium tuberculosis* and HIV/AIDS. Latest estimates clear that 10% of all recent tuberculosis infections are resistant to at least one anti- tuberculosis drug. In the recent 10 years the research on *Mycobacterium tuberculosis* and probable drug candidates has undergone much development with genome revealed and the discovery of diverse biological targets. The potential activities of numerous natural and synthetic compounds have been investigated against *Mycobacterium tuberculosis*. In this regard for designing, novel compounds against *Mycobacterium tuberculosis*, a database consisting of 400 mainly antimycobacterial compounds has been constructed. 1400 descriptors defined and classified to model antimycobacterial compounds on the basis of achieved information from Artificial Neural Network (ANN). The obtained descriptors were defined by DRAGON (version 3.0-2003). Three PLS, STEPWISE and Student –Newman-Keuls methods have been used to classify the resulting descriptors. On the base of data, ANN modeling has been performed by MATLAB 6.5-2002 software with R^2=0.73. The mentioned chemometrics tools are influential applicable utilities in novel drug discovery region and are applied to discover new candidates for antimycobacterial screening *in vitro* to predict possible MIC *in silico* and design novel antimycobacterial compounds in clinical treatment area.





МЕЛАНИНЫ КАК ПРОТЕКТОРЫ ГРИБА *PAECILOMYCES LILACINUS* ОТ РАДИАЦИОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Гесслер Н.Н., Егорова А.С., Белозерская Т.А.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия
e-mail:tabinbi@mail.ru

Устойчивость организмов к действию экстремальных факторов обусловлена наличием ферментативных и неферментативных антиоксидантных защитных систем, предупреждающих развитие окислительного стресса. Микроскопические грибы обладают многокомпонентной антиоксидантной системой, обеспечивающей им высокий потенциал выживания в условиях действия различных стрессорных факторов. На примере микроскопического гриба *Paecilomyces lilacinus* выявляли значимость ферментативных антиоксидантных компонентов (супероксиддисмутазы и каталазы) и наличия пигментов для выживания в условиях радиационного загрязнения.

Микроскопический почвенный гриб *P. lilacinus* обладает широким ареалом обитания, встречается в почвах разного типа и выдерживает большие техногенные нагрузки (загрязнение углеводородами, тяжелыми металлами, радионуклидами). В настоящее время *P. lilacinus* распространен в зоне Чернобыльской АЭС и его рассматривают как биоиндикатор высокого уровня радиационного загрязнения. Сравнение скоростей роста штаммов *P. lilacinus* из зон с фоновым уровнем радиоактивного загрязнения и штаммов из зоны ЧАЭС (радиоактивное загрязнение $1,22 \times 10^2$ – $5,92 \times 10^5$ Бк/кг) выявило для всех штаммов из зоны ЧАЭС повышение скорости роста при низкой концентрации глюкозы в среде (0,1-0,5%) в 1,5 раза [1]. Исследовали изменение содержания карбонильных групп в белках как показателя окислительного стресса при нагрузке H_2O_2. Все штаммы из зоны ЧАЭС проявили устойчивость к окислительному стрессу, в то время как фоновые реагировали на пероксидный стресс по-разному. Наибольшее увеличение содержания карбонильных групп в белках в ответ на добавление H_2O_2 наблюдали у штамма из Смоленской области, тогда как штаммы, выделенные из почв с высоким уровнем меди и из торфяной почвы, проявляли устойчивость к пероксидному стрессу, сходную со штаммами из зоны ЧАЭС. Изменение активности ферментативных механизмов защиты СОД и каталазы в ответ на действие H_2O_2 происходило у разных штаммов *P. lilacinus* независимо от места обитания и концентрации глюкозы в среде, т.е., по-видимому, было обусловлено индивидуальной особенностью рассмотренных штаммов.

Исследование штаммов светлоокрашенного гриба *P. lilacinus* впервые показало присутствие в мицелии меланинов [2]. Методом ЭПР было выявлено, что концентрация парамагнитных центров(ПЦ) в мицелии штаммов из зон с фоновым уровнем радиации была $0,2\text{-}2,2 \times 10^{16}$ ПЦ/г сухого веса, а в штаммах из зоны ЧАЭС выше – $3,41\text{-}7,93 \times 10^{16}$ ПЦ/г сухого веса. Полученные данные согласуются с отмечавшимся ранее явлением повышенной меланизации микобиоты Чернобыльской зоны [3]. Таким образом, все штаммы *P. lilacinus* из зоны ЧАЭС проявляли повышенную устойчивость к пероксидному стрессу и отличались повышенным содержанием меланинов в мицелии, тогда как активности антиоксидантных ферментов СОД и каталазы варьировали в широких пределах и не зависели от радиационного фона места первичного обитания штаммов. Полученные данные свидетельствуют о значимости меланиновых пигментов для устойчивости *P. lilacinus* к радиоактивному излучению.

Литература:

1. *К.Б. Асланиди, А.Е. Иванова, Н.Н. Гесслер, А.С. Егорова, Т.А. Белозерская.* // Сравнительное исследование адаптации к факторам окислительного стресса у штамма мицелиального гриба *Paecilomyces lilacinus* из зоны отчуждения ЧАЭС и штаммов того же вида, обитавших на территориях с фоновым уровнем радиоактивного загрязнения. Радиац. Биол. Радиоэкол. 2009, т. 49, № 4, с. 425-431.
2. *А.С. Егорова, Н.Н. Гесслер, Т.А. Белозерская.* // Меланиновые пигменты у гриба *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. ДАН, 2011, т. 437, №3, с. 413-415.
3. *Dighton J., Tugay T., Zhdanova N.* // Fungi and ionizing radiation from radionuclides. FEMS Microbiol. Lett. 2008, v. 281, №1, p. 109-120.

MELANINS AS PROTECTORS OF THE FUNGUS *PAECILOMYCES LILACINUS* AGAINST IONIZING RADIATION

Gessler N.N., Egorova A.S., Belozerskaya T.A.

Bach Institute of biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
e-mail:tabinbi@mail.ru

Resistance of living organisms to extreme environments depends on enzyme and nonenzyme antioxidant defence systems preventing oxidative stress development. Microscopic fungi possess multicomponent antioxidant system providing a high survival potential under various stress factors. Significance of enzyme antioxidant components superoxide dismutase (SOD) and catalase, as well as pigments, for survival under high radioactive pollution has been shown using a microscopic fungus *Paecilomyces lilacinus*.

Microscopic fungus *P. lilacinus* is widely distributed. It can be found in soils of different types and resists high technogenic loads (hydrocarbons, heavy metals and radionuclide pollutions). *P. lilacinus* is spread widely in Chernobyl Atomic Energy Station (ChAES) zone. It is considered as an indicator of high levels of radionuclide contamination there.

Comparison of growth rates of *P lilacinus* strains from habitats with background radiation and the strains from zone with radioactive pollution $1{,}22 \times 10^2$ – $5{,}92 \times 10^5$ Bk/kg revealed an increase in growth rates of ChAES strains under low glucose concentrations (0,1-0,5%) of about 1,5 times [1]. Variations in protein carbonyls as indicators of oxidative stress have been elucidated under H_2O_2 treatment. All the Chernobyl strains showed resistance to oxidative stress whereas the strains from zones with background radiation differently answered to peroxide stress. Protein carbonyls increased mostly in the Smolensk strain upon H_2O_2 addition. Strains from increased Cu^{2+} levels in soil and from peat coal soils were resistant to peroxide stress similarly to strains from ChAES zone. Change in activity of enzyme protective mechanisms SOD and catalase upon H_2O_2 treatment varied between *P. lilacinus* strains irrespective to their habitat and concentration of glucose in the medium. It was apparently caused by individual peculiarities of the strains tested.

Investigation of light-colored *P. lilacinus* strains revealed melanins for the first time [2]. Electron spin resonance spectroscopy (ESR) method revealed that paramagnetic centers (PC) concentration in mycelium of strains from background radiation zones were $0{,}2\text{-}2{,}2 \times 10^{16}$ PC per g dry weight . In strains from the Chernobyl zone PC concentration was higher –$3{,}41\text{-}7{,}93 \times 10^{16}$ PC per g dry weight. The data revealed bear mutual respondence with found earlier increased melanization of Chernobyl mycobiota [3]. Thus all Chernobyl *P. lilacinus* strains displayed high resistance to peroxide stress and high melanin level in mycelium. Activity of antioxidant enzymes SOD and catalase varied widely between the strains tested. The activity levels did not depend on radioactive contamination of the strain's habitat. Data revealed point to significance of melanine pigments for *P. lilacinus* resistance to ionizing radiation.

Литература:

1. *K.B. Aslanidi, A.E. Ivanova, N.N. Gessler, A.S. Egorova, T.A. Belozerskaya*. // A comparative investigation of oxidative stress factors a strain of mycelial fungus *Paecilomyces lilacinus* from Chernobyl atomic energy station and strains of the same species from territories with basic level of radioactive pollution. Radiat. Biol. Radioecol. 2009, v. 49, № 4, p. 425-431.
2. *A.S. Egorova, N.N. Gessler, T.A. Belozerskaya.* // Melanin pigments in the fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. Dokl. Biochem. Biophys. 2011, v. 437, №3, p. 413-415.
3. *Dighton J., Tugay T., Zhdanova N.* // Fungi and ionizing radiation from radionuclides. FEMS Microbiol. Lett. 2008, v. 281, №1, p. 109-120.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕЛИКТОВЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

[1]Грива Г.И., [2]Брушков А.В., [3]Деримедведь Л.В., [1]Каленова Л.Ф., [4]Репин В.Е., [4]Зенкова М.А.

[1] Тюменский научный центр СО РАН, Тюмень, Россия, e-mail: grivag@mail.ru
[2] Московский государственный университет им.М.В. Ломоносова, Москва, Россия
[3] Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина
[4] Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Из древних многолетнемерзлых толщ Центральной Якутии, возраст которых превышает 3 млн. лет, выделен и исследован ряд культивируемых реликтовых микроорганизмов. Выполненные идентификация по 16S rDNA и полногеномное секвенирование штаммов показывают, что они являются новыми видами, большинство из которых принадлежат к роду *Bacillus*. Обнаруженные бактерии немногочисленны, содержатся в мерзлых породах в виде единичных выживших клеток, относятся к психротолерантным непатогенным микроорганизмам и отличаются от современных видов повышенной антибиотикочувствительностью; незначительными антагонистическими свойствами; высокой резистентностью к неблагоприятным факторам внешней среды; способностью к активному росту в широком диапазоне значений температур и кислотности; обладают специфичным набором других биохимических показателей.

Уникальность реликтовых микробных клеток заключается и в их способности на протяжении многих тысяч и миллионов лет препятствовать разрушению генетического аппарата, что предполагает наличие особых неизвестных пока механизмов защиты или репараций ДНК от тепловой деструкции, излучений, свободных радикалов и других повреждающих факторов.

Выполненный нами комплекс исследований влияния реликтовых бактерий на высшие организмы позволяет говорить об их перспективности для получения широкого спектра биологически активных веществ. На лабораторных животных исследовались культуры микроорганизмов, бактериальные лизаты и их производные.

Установлен высокий уровень антимикробной активности ряда реликтовых штаммов по отношению к *P. aeruginosa, S. aureus, C. albicans* и другим патогенным видам.

Доказано положительное влияние штамма *Bacillus F* на регенераторные процессы в организме, в т.ч. на процессы регенерации при асептическом повреждении мягких тканей и на скорость заживления поверхностных ран при различных типах экспериментальных нарушений кожных покровов.

Исследования гепатозащитных свойств лизата *Bacillus F* при остром тетрахлорметановом гепатите, выполненные на экспериментальных моделях показали, что входящие в состав лизата биологически активные вещества обладают способностью нормализовать процессы свободнорадикального окисления и стабилизировать антиокислительную систему гепатоцитов.

В процессе исследования противоязвенного эффекта биологически активных веществ, содержащихся в лизатах реликтовых микроорганизмах установлено, что они проявляют более выраженные противовоспалительные свойства по сравнению с эталонными препаратами (Гастровитол и др.) на моделях экспериментальных колитов. Это подтверждено уменьшением количества лейкоцитов, моноцитов и другими показателями периферической крови лабораторных животных.

Оценка радиопротекторных свойств выполнена в серии радиобиологических экспериментов на разных видах лабораторных животных, получавших воздействие ионизирующей радиации в среднелетальной и минимально абсолютно летальной дозах. Результаты свидетельствуют о наличии ярко выраженных противолучевых и гемостимулирующих свойств у лизата Bacillus F, что позволяет говорить о перспективности разработки на его основе эффективных радиопрофилактических и радиотерапевтических препаратов.

Не меньший практический интерес представляют и результаты исследований кардиопротекторного действия лизата ряда штаммов реликтовых микроорганизмов, полученные на моделях изадринового миокардита.

Нами также исследован штамм *Bacillus F* в качестве иммуномодулирующего биокорректора, способного запускать врожденный иммунный ответ. Установлено дозозависимое усиление метаболизма макрофагов, повышение уровней интерферона-гамма (IFN-γ), снижение фактора некроза опухолей (TNF-α) и активация цитотоксического действия Т-лимфоцитов при интраперитонеальных инъекциях, что свидетельствует об активации врожденного иммунитета у лабораторных животных и о выраженных иммуномодулирующих свойствах штамма.

Данные свойства подтверждены и в серии других экспериментов, в процессе которых выявлено стимулирующее влияние штамма на активность клеточного и гуморального иммунитета, фагоцитарную активность макрофагов, широкий спектр морфофизиологических показателей, мышечную силу, двигательную активность и деятельность центральной нервной системы. Кроме того, зафиксирован устойчивый геронтологический эффект.

Литература:

1.*A.V. Brouchkov, V.P. Melnikov, Yu.G. Sukhovei, G.I. Griva, V.E. Repin, L.F. Kalenova, E.V. Brenner, A.M. Subbotin, Y.B. Trofimova, M. Tanaka, T. Katayama, M. Utsumi.* Relict Microorganisms of Cryolithozone as Possible Objects of Gerontology. ISSN 2079-0570, Advances in Gerontology, 2011, Vol. 1, No. 1, pp. 39–44. © Pleiades Publishing, Ltd., 2011.

RELICT PERMAFROST MICROORGANISMS AS A SOURSE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

[1]Griva G.I., [2]Brouchkov A.V., [3]Derimedved L.V., [1]Kalenova L.F., [4]Repin V.E. , [4]Zenkova M.A.

[1] Tyumen Scientific Center, Siberian Branch of Russian Academy of Science, Tyumen, Russia
e-mail: grivag@mail.ru
[2] Moscow State University, Moscow, Russia
[3] National Pharmaceutical University, Kharkiv, Ukraine
[4] Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia

A number of cultured relic microorganisms from ancient permafrost of Central Yakutia, aged more than 3 million years, isolated and examined. According to identification by 16S rDNA and sequencing of full genomes theses strains are new species and belong to the *Bacillus* mostly. Detected bacteria are not numerous, they are contained in frozen soils as single viable cells, and belong to non-pathogenic microorganisms. They have increased antibiotic susceptibility, minor antagonist properties and high resistance to extreme environmental factors. They also have a specific set of biochemical features, such as an ability to active growth in a wide range of temperatures, acidity, etc.

However, the main unique feature of the relic microbial cells is their ability to preserve (or repair) their genome for many thousands or even millions of years in spite of extreme conditions of permafrost. Obviously, they have specific DNA protection mechanisms against thermal degradation, radiation, free radicals and other damaging factors.

We have performed a research of influence of the relict bacteria on higher organisms and have found they can be useful for production of a wide range of biologically active substances.

A high level of antimicrobial activity of relict strains with respect to *P. aeruginosa, S. aureus, C. albicans* and other pathogenic species has been found.

The positive influence of *Bacillus F* strain on regenerative processes is observed, including regeneration of soft tissue injuries and healing of superficial wounds of animal skin.

Studies of hepatoprotective properties of *Bacillus F* strain lysate with acute tetrahlormetan hepatitis have shown that biologically active substances have the ability to normalize the process of free radical oxidation and to stabilize the hepatocytes antioxidant system. Lysates of relic microorganisms exhibit anti-inflammatory properties compared with references (Gastrovitol, etc.). It is confirmed by reduction of quantity of leucocytes, monocytes and other indicators of peripheric blood of laboratory animals.

We have also studied a strain of *Bacillus F* as immunomodulatory biocorrector which are able to launch an innate immune response. A dose-dependent enhancement of metabolism of murine peritoneal macrophages estimated on the production of reactive oxygen intermediates (ROIs) has been found; increasing levels of interferon-gamma (IFN-γ); reduction of tumor necrosis factor (TNF-α) and activation of cytotoxic activity of T-lymphocytes after intraperitoneal injections were observed. An activation of innate immunity of laboratory animals and immunomodulatory properties of the strain have been shown.

These properties were observed in different experiments. The stimulating effects of strain on the activity of cellular and humoral immunity, phagocytic activity of macrophages, a wide range of morphological parameters, muscle strength, motor activity and the activity of the central nervous system have been found. A steady gerontological effect was also observed.

References:

1.*A.V. Brouchkov, V.P. Melnikov, Yu.G. Sukhovei, G.I. Griva, V.E. Repin, L.F. Kalenova, E.V. Brenner, A.M. Subbotin, Y.B. Trofimova, M. Tanaka, T. Katayama, M. Utsumi.* Relict Microorganisms of Cryolithozone as Possible Objects of Gerontology. ISSN 2079-0570, Advances in Gerontology, 2011, Vol. 1, No. 1, pp. 39–44. © Pleiades Publishing, Ltd., 2011.

ОКСИПРОИЗВОДНЫЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ КАК ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖИЗНЕННЫХ ПРОЦЕССОВ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

[1]Гроза Н.В., [1]Дородникова Е.А.,[2]Филиппович С.Ю., [2]Бачурина Г.П., [2]Гесслер Н.Н., [2]Белозерская Т.А.

[1]Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
e-mail: miagkova@mail.ru
[2]Учреждение Российской Академии Наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, Россия

Продукты окисления природных полиненасыщенных жирных кислот, известные под названием оксилипины, играют важную биологическую роль в сигнальных процессах микроорганизмов. Актуальной задачей является исследование механизмов действия этих соединений в регуляции жизненного цикла микроскопических грибов, а также в процессах адаптации грибов к действию различных факторов и в повышении их биопродуктивных возможностей.

Объектом для биологических испытаний был выбран штамм мицелиального гриба-аскомицета *Neurospora crassa*. Эти грибы являются наиболее изученной моделью по составу генома и метаболическим путям. *Neurospora crassa* характеризуется наличием циклов полового размножения (образование перитециев, асков) и бесполого (образование конидий).

Инструментами для исследования грибов выбраны полученные нами методом полного химического синтеза оксилипины: 3-HETE (3(*R*)-гидрокси-(5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-эйкозатетраеновая кислота) [1], 18-HODE (18-гидрокси-(9*Z*,12*Z*)-октадекадиеновая кислота) [2], которые добавляли к культуре *Neurospora crassa* в микромолярных (1-20 мкМ) концентрациях. В качестве контроля использовали не окисленную линолевую кислоту – LA (9*Z*,12*Z*-октадекадиеновую кислоту).

Результаты биологических экспериментов показали дозозависимое усиление способности гриба к образованию половых структур (протоперитециев) в присутствии оксилипина (3-HETE) в 3-5 раза. Действие оксигенированного производного линолевой кислоты (18-HODE) также увеличивало количество протоперитециев в 3 раза. Однако добавление не окисленной линолевой кислоты в тех же концентрациях не сказывалось на образовании предшественников женских половых структур. Кроме того, добавление 3-HETE к культуре *N.crassa* приводило к ингибированию светозависимого образования конидий у гриба и стимулированию этого процесса в темноте. По результатам этих исследований можно предположить наличие соответствующих рецепторов к оксилипинам в клетках *N.crassa*, что открывает возможность влиять на репродуктивную способность биотехнологически значимых штаммов грибов с целью повышения продукции биологически активных веществ (каротиноидов, липидов, жирных кислот).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Минобрнауки РФ АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы» (грант № 2.1.1/2889).

Литература:

1. *Groza N.V., Ivanov I.V., Romanov S.G., Myagkova G.I., Nigam S.* A novel synthesis of 3(*R*)-HETE, 3(*R*)-HTDE and enzymatic synthesis of 3(*R*),15(*S*)-DiHETE // Tetrahedron. – 2002. - V. 58. - P. 9859-9863.
2. *Гроза Н.В., Иванов И.В., Голованов А.Б., Мягкова Г.И.* Химический синтез омега-гидроксипроизводных растительных жирнокислотных субстратов // Вестник МИТХТ. – 2006. – Т. 1, № 4. – С. 29-32.

OXYDERIVATIVES FATTY ACID AS A TOOL FOR THE STUDY OF MYCELIAL FUNGI VITAL PROCESSES

[1]Groza N.V., [1]Dorodnikova E.A., Filippovich S.U., [2]Bachurina G.P., [2]Gessler N.N., [2]Belozerskaya T.A.

[1] Moscow Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia
e-mail: miagkova@mail.ru
[2] Instutute of Biochemistry named after A.N. Bach RAS, Moscow, Russia

Products of natural polyunsaturated fatty acids oxygenation, known as oxylipins, play an important biological role in signaling processes of microorganisms. Relevant problem is study the mechanisms of action of these compounds in the regulation of vital cycle of microscopic fungi, in fungal adaptation to action of various factors as well as in improving fungal productive capabilities.

Object for biological research was strain of fungus, mycelial ascomycetes *Neurospora crassa*. These fungi are the most studied models of genome composition and metabolic paths. *Neurospora crassa* is characterized by cycles of sexual (formation of perithecia, asci) and asexual (formation of conidia) reproduction.

Tools for the study of fungi were oxylipins obtained by total chemical synthesis: 3-HETE (3(*R*)-hydroxy-(5*Z*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-eicosatetraenoic acid) [1], 18-HODE (18-hydroxy-(9*Z*,12*Z*)-octadecadienoic acid) [2]. They were added to the cell culture *Neurospora crassa* in micro molar (1-20 мкМ) concentrations. We used non oxygenated linoleic acid (LA - 9*Z*,12*Z*- octadecadienoic acid) as a control.

The results of biological experiments showed that dose-dependent enhancement of ability of the fungus to the formation of sexual structures (proto-perithecia) in presence of oxylipin (3-HETE) increased in 3-5 times. The action of linoleic acid oxygenated derivative (18-HODE) also increased the number of proto-perithecia 3 times. However, the addition of non oxygenated linoleic acid in the same concentrations had no effect on the formation of precursors of female reproductive structures. Besides, the addition of 3-HETE to the culture *N.crassa* resulted in inhibition of light depended formation of fungal conidia and stimulated this process in the dark. The results of these studies suggest the presence of the oxylipin-sensitive receptors in cells *N.crassa* and open the opportunity to influence the reproductive ability of biotechnologically important fungal strains to increase production of biologically active substances (carotenoids, lipids, fatty acids).

The work was supported in part by grant of Russian Ministry of Education and Science (№ 2.1.1/2889).

References:

1. *Groza N.V., Ivanov I.V., Romanov S.G., Myagkova G.I., Nigam S.* A novel synthesis of 3(*R*)-HETE, 3(*R*)-HTDE and enzymatic synthesis of 3(*R*),15(*S*)-DiHETE // Tetrahedron. – 2002. - V. 58. - P. 9859-9863.
2. *Groza N.V., Ivanov I.V., Golovanov A.B., Myagkova G.I.* Chemical synthesis of omega-hydroxyderivatives of plant fatty acid substrates // Bulletin of MITHT. – 2006. – V. 1, № 4. – P. 29-32.

ПІДВИЩЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ ЦІННОСТІ ЇСТІВНИХ ТА ЛІКАРСЬКИХ ГРИБІВ ЗА РАХУНОК ЗБАГАЧЕННЯ ЇХ МІНЕРАЛЬНОГО СКЛАДУ НАНОКАРБОКСИЛАТАМИ БІОГЕННИХ МЕТАЛІВ

[1]Гуліч М.П., [2]Бісько Н.А., [3]Каплуненко В.Г., [1]Ященко О.В., [2]Митропольська Н.Ю., [3]Косінов М. В.

[1] ДУ«Інститут гігієни та медичиної екології ім. О. М. Марзєєва НАМН України», Київ, Україна
[2]«Інститут ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України», Київ, Україна
[3] ТОВ «Наноматеріали і нанотехнології», Київ, Україна
e-mail: gumapa@ukr.net

В останній час все більший інтерес щодо використання в харчуванні людини та медичній практиці набувають вищі базидіальні їстівні та лікарські гриби, як природний комплекс біологічно активних речовин, для створення нового виду продуктів харчування, а саме спеціальних харчових продуктів: дієтичних добавок, функціональних харчових продуктів, продуктів спеціального дієтичного споживання. Оздоровчі, профілактичні та лікувальні властивості грибів знаходяться на стадії активного вивчення.

Відомо, що серед необхідних складових високої біологічної цінності харчових продуктів важливе місце займають макро- та мікроелементи, на сам перед есенціальні біометали. Вивчення вмісту біогенних металів в грибах представляє собою дуже великий інтерес з точки зору їх харчових, біологічних і лікарських властивостей.

Чисельні дослідження мінерального складу як болетальних, так і базидіальних грибів показали високій рівень біоакумуляції плодовими тілами грибів фізіологічно важливих незамінних для людини мікроелементів- Zn, Fe, Cu, Mn, Mo, Se, Ge. Особливий інтерес викликає той факт, що різноманітні лікарські гриби здатні накопичувати такі важливі для життєдіяльності та здоров'я людини мікроелементи як селен і германій. Саме завдяки можливості лікарськими грибами акумулювати германій пояснюються імуностимулюючі та протипухлинні властивості грибів Шиітакі та Ганодерма.

Сучасне промислове вирощування лікарських та лікарсько-їстівних грибів, завдяки внесенню в культуральний субстрат карбоксилатів біогенних металів нового покоління, а саме нанокарбоксилатів, дозволяє спрямовано збагачувати міцелій грибів ессенціальними біометалами та отримувати грибну сировину з високою біологічною активністю.

Можливість отримання нанокарбоксилатів з принципово новими корисними характеристиками з'явилася в результаті інтенсивного розвитку нанотехнологій. Так, за допомогою аквананотехнології отримано цитрати, сукцинати, лактати та інші карбоксилати біогенний металів, що дає змогу збагачення харчових продуктів мікроелементами у формі біотичних сполук з високою хімічною чистотою і біодоступністю. Виникла також реальна перспектива збагачення мінерального складу грибів ессенціальними біометалами.

Нами вперше встановлена закономірність інтенсивності сорбції таких ессенціальних мікроелементів як Cu, Zn, Fe, Ge біомасою лікарських та їстівних грибів P.ostreatus, G. lucidum, C.sinensis, C.militaris при культивуванні їх на рідкому середовищі з розчином цитратів цих біометалів.

INCREASE OF BIOLOGICAL VALUE OF EDIBLE AND MEDICINAL FUNGI OWING TO THE ENRICHMENT OF THEIR MINERAL COMPOSITION WITH NANOCARBOXYLATES OF BIOGENIC METALS

[1]Gulich M.P., [2]Bisko N.A., [3]Kaplunenko V.G., [1]Yashchenko O.V., [2]Mitropolska N.Yu., [3]Kosinov M.V.

[1]SI "A.N.Marzeiev Institute for Hygiene and Medical Ecology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine
[2] M.G.Kholodni Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
[3] Nanomaterials and Nanotechnologies Ltd., Kyiv, Ukraine
e-mail: gumapa@ukr.net

Lately the application of the higher Basidiomycetes edible and medicinal fungi as a natural complex of biologically active substances for the creation of a new kind of the foodstuffs, that is special foodstuffs: dietetic additives, functional foodstuffs, products of special dietetic consumption in a human nutrition and medical practice arouses more interest. Sanitary, preventive and curative properties of the fungi are at the stage of active study.

It is known that macro- and microelements, first of all the essential biometals, are among necessary components of the foodstuffs of a high biological value. Study of the content of biogenic metals in fungi is of great interest from the point of view of their nutritional, biological and medicinal properties.

Numerous research of fungi mineral composition demonstrated a high level of bioaccumulation of significant and indispensible for a human microelements – Zn, Fe, Cu, Mn, Mo, Se, Ge by fungi fruit body. It is especially interesting that various medicinal fungi can accumulate such important for a human vital activity and health microelements as selenium and germanium. Immunostimulating and antitumor possibilities of the fungi Lentinus edodes and Ganoderma lucidum are explained just owing to a possibility of germanium accumulation by the medicinal fungi.

Owing to the introduction of the carboxylates of biogenic metals of a new generation, namely nanocarboxylates, into the cultural substrate a contemporary industrial incubation of medicinal and medicinal-and-edible fungi allows to enrich purposefully a fungi mycelium with the essential biometals and to produce fungi raw materials with a high biological activity.

A possibility for the production of nanocarboxylates with the principally new useful features resulted from of the intensive development of nanotechnologies. Citrates, succinates, lactates and other carboxylates of biogenic metals were produced with the help of aquananotechnologies. It gives a possibility to enrich the foodstuffs with the microelements in the form of biotic compounds with a high chemical purity and bioavailability. A real perspective of the enrichment of fungi mineral composition with the essential biometals arose also.

For the first time we determined a regularity of sorption intensity of such essential microelements as Cu, Zn, Fe, Ge with a biomass of medicinal and edible fungi P.ostreatus, G.lucidum, C.sinensis, C.militaris at their cultivation on the liquid medium with a solution of the citrates of these biometals.

ПОЛУЧЕНИЕ БИОМАССЫ СИНЕ-ЗЕЛЁНОЙ ВОДОРОСЛИ *SPIRULINA PLATENSIS*, С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЛИПИДОВ

[1]Джур С. В., [2]Ефремова Н.В., [1]Бульмага В.П.

[1]Молдавский Государственный Университет, Кишинев, Молдова
[2]Институт Микробиологии и Биотехнологии Академии Наук Молдовы, Кишинев, Молдова
e-mail: efremova.nadejda@gmail.com

Сине-зелёная водоросль *S. Platensis* широко используется в качестве биологически активной добавки, а в последнее время находит все большее применение в качестве источника для получения многих ценных веществ для человека. Сочетание пластичности метаболизма и биомассы, богатой белком, витаминами группы В: B_1, B_2, B_6 и B_{12}, провитамином А, полисахаридами, липидами, микроэлементами делает эту микроводоросль несомненным лидером среди остальных объектов фикобиотехнологии [1].

Биомасса спирулины содержит целый ряд биоактивных веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, таких как липиды (полиненасыщенные жирные кислоты), каротиноиды (β-каротин, зеаксантин, лютеин), витамины (α-токоферол) и др. Липиды, полученные на основе спирулины, обладают антиоксидантной и антимикробной активностью [2].

На протяжении последних тридцати лет значительно возрос интерес к германию, в особенности к его органическим соединениям, благодаря их биологическим свойствам (обеспечивание переноса кислорода в тканях организма, повышение иммунного статуса организма, проявление противоопухолевой активности). Ранее сотрудниками лаборатории «Фикобиотехнология» (Молдавский Государственный Университет) было установлено, что некоторые соединения германия способствуют накоплению германия и некоторых биоактивных веществ в биомассе *Spirulina platensis* [3-4]. Представляет интерес получение пищевых биодобавок на основе биомассы спирулины с повышенным содержанием липидов и германия, так как они могут оказаться более эффективными и с большим спектром воздействия, чем другие биодобавки.

Цель исследования: получение биомассы сине-зеленой водоросли *Spirulina platensis* с повышенным содержанием липидов.

Объект исследования: сине-зелёная водоросль *Spirulina platensis CNM-CB-02*, хранящаяся в Национальной Коллекции Непатогенных Микроорганизмов Института Микробиологии и Биотехнологии Академии Наук Республики Молдова. Спирулина культивировалась на питательной среде Зароук [5]. В качестве регуляторов роста и стимуляторов синтеза липидов были использованы неорганические соединения германия: GeO_2 и $GeSe_2$, внесенные в питательную среду в концентрациях 10-50 мг/л. Определение содержания липидов осуществлялось по методу [6].

Наибольшее содержание липидов в биомассе спирулины культивированной в присутствии GeO_2 и $GeSe_2$ наблюдалось при их концентрации 30 мг/л с увеличением на 35 и 20%, соответственно, по сравнению с контролем. Таким образом, для получения биомассы обогащенной липидами более эффективным оказалось соединение GeO_2.

Так, согласно результатам исследования, соединения германия могут быть использованы в качестве стимулятора синтеза липидов в биомассе спирулины. Биомасса сине-зелёной водоросли *Spirulina platensis* с повышенным содержанием липидов может быть рекомендована для получения пищевых биодобавок с дальнейшим применением для лечения и профилактики некоторых заболеваний.

Литература:

1. *Rudic, V.* // Ficobiotehnologie - cercetări fundamentale şi realizări practice. Editura Elena - VI, Chişinău, 2007, 364 p.
2. *M.F. Ramadan, M.M.S. Asker, Z.K. Ibrahim.* **//** Functional Bioactive Compounds and Biological Activities of *Spirulina platensis* Lipids - Czech J. Food Sci., 2008 Vol. 26, N. 3, p. 211–222
3. *Djur S., Rudic V. , Bulimaga V.* // Influența unor compuşi ai Ge(IV) asupra productivităţii cianobacteriei *Spirulina platensis* şi acumulării germaniului în biomasă. Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei, Ştiinţele vieţii. Chişinău, 2007, N. 2, (7) , p. 139-144
4. *Максакова С.* // Влияние GeO_2 и $GeSe_2$ на продуктивность и процесс накопления биоактивных веществ в биомассе *Spirulina platensis*. Anale ştiinţifice ale USM", Seria "Ştiinţe chimico-biologice", Chişinău. CE USM, 2005, p.248-252.
5. *Zarrouk C.* // Contribution a le.tude du cyanophycee. Influence dedivers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et laphotosynth se de Spirulina maxima (Setch et Gardner) Geitl., PhD, Paris, 1966
6. *V. Rudic, V. Gudumac, V. Bulimaga, L. Dencicova, V. Ghelbet, T. Chiriac.* // Metode de investigaţii în ficobiotehnologie. Elaborare metodică. Chişinău, 2002, 60p

THE OBTAINING BIOMASS OF BLUE-GREEN ALGAE *SPIRULINA PLATENSIS* WITH HIGH CONTENT OF LIPIDS

[1]Dur S. V., [2]Efremova N.V., [1]Bilimaga V. P.

[1] The State University of Moldova, Chishinau, Moldova
[2] Institute of Microbiology and Biotehnology of ASM, Chishinau, Moldova
e-mail: efremova.nadejda@gmail.com

The blue-green algae *S*. platensis is widely used as a dietary supplement in recent years and presents a source of many valuable bioactive substances with beneficial effects on *human health.* The combination of the plasticity of metabolism and biomass properties, rich in protein, B vitamins: B1, B2, B6 and B12, provitamin A, polysaccharides, lipids and trace elements makes this algae to become a leader among the other objects of phycobiotehnology [1].

The biomass of Spirulina contains a variety of bioactive substances with antioxidant properties, such as: lipids (unsaturated fatty acids), carotenoids (β-carotene, zeaxanthin, lutein), vitamins (α-tocopherol), et. al. Lipids obtained on the basis of spirulina possess antioxidant and antimicrobial activity [2].

Over the past few decades, the interest to germanium for medical use has been increased, especially to the organic compounds of germanium due to their biological properties (transport of oxygen in body tissues, increasing of the immune status, antitumor activity). Previously, the laboratory staff „Phycobiotehnology" (State University of Moldova) has been found that certain compounds of germanium contribute to the accumulation of some bioactive substances and germanium in the biomass of *Spirulina platensis* [3-4]. The obtaining of dietary supplements on the basis of spirulina biomass with high content of lipids and germanium contribute to the elaboration of new effective bioadditives.

The aim of investigation: the obtaining of *Spirulina platensis* biomass with high lipid contents.

The object of study: blue-green algae *Spirulina platensis CNM-CB-02*, deposited in the National Collection of Non-Pathogen Microorganisms of Institute of Microbiology and Biotehnology of Academy of Sciences of Moldova. Spirulina was cultivated on the nutritive medium Zarrouk [5]. The inorganic germanium compounds: GeO_2 and $GeSe_2$ were used as plant growth regulators and stimulators of lipid synthesis, supplied to the culture medium in concentrations of 10-50 mg/l. The lipids content was determined by the method described in [6].

The maximum lipid content in spirulina biomass cultivated in the presence of GeO_2 and $GeSe_2$ has been recorded at concentrations of 30 mg/l with an increase of 35 and 20%, respectively, compared to the blank. Thus, the utilization of GeO_2 to produce biomass with high lipid content was more efficient.

According to the results of investigation, the compounds of germanium can be used as a stimulators of lipid synthesis in the spirulina biomass. Biomass of blue-green alga Spirulina platensis with high lipid content can be used for the elaboration of bioadditives with the following utilization in treatment and profilaxy of many deseases.

References:

1. *Rudic, V.* // Ficobiotehnologie - cercetări fundamentale şi realizări practice. Editura Elena - VI, Chişinău, 2007, 364 p.
2. *M.F. Ramadan, M.M.S. Asker, Z.K. Ibrahim. II* Functional Bioactive Compounds and Biological Activities of *Spirulina platensis* Lipids - Czech J. Food Sci., 2008 Vol. 26, N. 3, p. 211–222
3. *Djur S., Rudic V. , Bulimaga V.* // Influenţa unor compuşi ai Ge(IV) asupra productivităţii cianobacteriei *Spirulina platensis* şi acumulării germaniului în biomasă. Buletinul Academiei de Ştiinţe a Moldovei, Ştiinţele vieţii. Chişinău, 2007, N. 2, (7), p. 139-144
4. *Максакова С.* // Влияние GeO_2 и $GeSe_2$ на продуктивность и процесс накопления биоактивных веществ в биомассе *Spirulina platensis*. Anale ştiinţifice ale USM", Seria "Ştiinţe chimico-biologice", Chişinău. CE USM, 2005, p.248-252
5. *Zarrouk C.* // Contribution a le.tude du cyanophycee. Influence dedivers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et laphotosynth se de Spirulina maxima (Setch et Gardner) Geitl., PhD, Paris, 1966
6. *V. Rudic, V. Gudumac, V. Bulimaga, L. Dencicova, V. Ghelbet, T. Chiriac.* // Metode de investigaţii în ficobiotehnologie. Elaborare metodică. Chişinău, 2002, 60p

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДРОЖЖЕЙ РОДА *SACCHAROMYCES* В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКА ЭНЗИМОВ С АНТИОКСИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Ефремова Н., Молодой Е., Усатый А., Топалэ Л., Фулга Л., Чеботаренко С.

Институт Микробиологии и Биотехнологии АН Молдовы, Кишинёв, Молдова
e-mail: efremova.nadejda@gmail.com

Согласно многочисленным литературным данным, окислительный стресс, обусловленный образованием свободных радикалов, служит причиной развития различных нарушений, таких как атеросклероз, болезнь Паркинсона и Альцгеймера, аутоиммунные заболевания, атопический дерматит и т.д. [1-3]. В связи с этим, возрос интерес исследователей к натуральным антиоксидантам - биологически активным соединениям, широко распространенным в природе.

Особое участие в процессах нейтрализации свободных радикалов клетки принимают энзимы с антиоксидантными свойствами, такие как: супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ) [4]. Супероксиддисмутаза является единственным среди известных антиоксидантных ферментов, обеспечивающих обрыв цепей кислородзависимых свободнорадикальных реакций в клетках живых организмов непосредственно, осуществляя рекомбинацию радикалов O_2^- с образованием перекиси водорода и триплетного кислорода [5]. Каталаза, в свою очередь, последовательно окисляет пероксид водорода до молекулярного кислорода и воды [5].

Одной из актуальных проблем является поиск новых источников первичной материи для разработки медицинских препаратов, биодобавок с широким спектром антиоксидантного действия. Большую перспективу в данном контексте представляет использование, в качестве важного источника антиоксидантных энзимов дрожжей рода *Saccharomyces,* являющихся ценным биотехнологическим объектом [6-7]. Дрожжи обладают некоторыми существенными преимуществами по сравнению с традиционными источниками энзимов с антиоксидантным эффектом. К преимуществам дрожжей рода *Saccharomyces* относятся: высокая скорость роста, небольшой срок культивирования(4-5 дней), относительно невысокая цена компонентов питательных сред. Помимо этого, исключается необходимость применения биологического материала животного и растительного происхождения для получения супероксиддисмутазы и каталазы, что значительно сокращает затраты на производство и снижает вероятность получения инфицированных экстрактов в случае использования эритроцитов крупного рогатого скота и птиц. Белковые экстракты на основе супероксиддисмутазы и каталазы, полученные из дрожжей, могут быть с успехом использованы в пищевой промышленности, а также различных областях медицины.

***Литература*:**

1. *Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Lunec, J.* // Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease - FASEB Journal, 2003, vol. 17, N 10, p. 1195-1214.
2. *Cottier H., Hodler J., Kraft R.* // Oxidative Stress: Pathogenetic Mechanisms - Research in complementary medicine, 1995, vol. 2, N 5, p. 124-127.
3. *Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M.* // Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer – Chem. Biol. Interact., 2006, vol. 160, N 1, p.1-40.
4. *Greenwald, R.* // Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases a critical review - Free Radical Biology and Medicine, 1990, vol. 8, N 2, p. 201-209.
5. *Turrens, J.* // Superoxide Dismutase and Catalase. Comprehensive Toxicology - Biotransformation. Oxford: Elsevier, 2010, vol. 4, p. 219-227.
6. *Ferreira, I., Pinhoa, O., Vieira, E., Tavarela, J.* // Brewers Saccharomyces yeast biomass: characteristics and potential applications - Trends in Food Science & Technology, 2010, N 21, p. 77-84.
7. *Lushchak, V.* // Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes - Acta Biochimica Polonica, 2006, vol. 53, N 4, p. 679–684.

PROSPECTS FOR UTILIZATION OF *SACCHAROMYCES* YEAST STRAIN AS A SOURCE OF ENZYMES WITH ANTIOXIDANT PROPERTIES

Efremova N., Molodoi E., Usatii A., Topala L., Fulga L., Cebotarenco S.

Institute of Microbiology and Biotechnology of Academy of Sciences of Moldova, Chisinau, Moldova
e-mail: efremova.nadejda@gmail.com

According to recent literature data, oxidative stress caused by free radical formation is involved in the etiology of various disorders, such as atherosclerosis, Alzheimer's and *Parkinson's* disease, autoimmune deseases, *atopic dermatitis and other* [1-3]. The use of *natural antioxidants*- biologically active substances widely distributed in nature, is of *great interest of many* researchers.

A special part in the process of neutralization of free radicals of cell take enzymes with antioxidant properties, such as: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) [4].Superoxide dismutase is unique among the known antioxidant enzymes, providing the breaking of chains of oxygen free radical reactions in the cells of living organisms directly, carrying out the recombination of O_2^- radicals with the formation of hydrogen peroxide and triplet oxygen [5]. Catalase sequentially oxidizes hydrogen peroxide to molecular oxygen and water [5].

One of the actual problems is the search for new sources of primary material for the elaboration of medical preparations, food supplements with a wide range of antioxidant action. The utilization of *Saccharomyces* yeast strains as the source of antioxidant enzymes *presents* the *perspective* of the further investigation [6-7]. Yeast has some advantages compared with traditional sources of enzymes with antioxidant effect. The advantages of *Saccharomyces* yeast strain are: high growth rate, a short period of cultivation (4-5 days), the relatively low price of the components of nutrient medium. In addition, there is no need to use the biological material of animal and vegetable origin for superoxide dismutase and catalase obtaining that significantly reduces production costs and reduces the risk of obtaining of infected extracts in the case of utilization of bovine erythrocytes. Protein extracts on the base of superoxiddismutase and catalase from *Saccharomyces* yeast strains could be used for the obtaining of bioadditives, medical preparations and cosmetic products with antioxidant effects.

References:

1. *Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Lunec, J.* // Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease - FASEB Journal, 2003, vol. 17, N 10, p. 1195-1214.
2. *Cottier H., Hodler J., Kraft R.* // Oxidative Stress: Pathogenetic Mechanisms - Research in complementary medicine, 1995, vol. 2, N 5, p. 124-127.
3. *Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M.* // Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer – Chem. Biol. Interact., 2006, vol. 160, N 1, p.1-40.
4. *Greenwald, R.* // Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases a critical review - Free Radical Biology and Medicine, 1990, vol. 8, N 2, p. 201-209.
5. *Turrens, J.* // Superoxide Dismutase and Catalase. Comprehensive Toxicology - Biotransformation. Oxford: Elsevier, 2010, vol. 4, p. 219-227.
6. *Ferreira, I., Pinhoa, O., Vieira, E., Tavarela, J.* // Brewers Saccharomyces yeast biomass: characteristics and potential applications - Trends in Food Science & Technology, 2010, N 21, p. 77-84.
7. *Lushchak, V.* // Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of proteins in eukaryotes - Acta Biochimica Polonica, 2006, vol. 53, N 4, p. 679–684.

СКРИНИНГ БАЗИДИОМИЦЕТОВ – ПРОДУЦЕНТОВ ЦЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА РАСТИТЕЛЬНЫХ ОТХОДАХ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

[1]Иванова Т.С., [1]Бисько Н.А., [1]Барштейн В.Ю., [1]Круподерова Т.А., [2]Антоненко Л.А., [3]Мегалинская А.П.

[1] Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины», Киев, Украина
e-mail: ivanova_tatiana_wat2@bigmir.net
[2] Национальный технический университет Украины «КПИ», Киев, Украина
[3] Национальный педагогический университет им. Н.П. Драгоманова, Киев, Украина

Медицинские свойства грибов использовали еще с древних времен, а в наше время ученые исследуют их в качестве растительного лекарства за их «магические» терапевтические свойства в борьбе против рака, гепатита, СПИДа и высокого уровня холестерина. В то же время грибные ферменты используют для биоремедиации, в бумажной промышленности, при приготовлении сыра, для превращения корма для животных в более доступную форму и т.д. Здоровое питание приобретает все большую важность, а грибы являются его необходимым компонентом, так как они богаты белком, бедны простыми карбогидратами, обладают обилием пищевых волокон, антиоксидантов, но содержат мало жиров. Итак, можно сделать вывод, что грибы – это важный источник биологически активных веществ. Возможно выращивать грибы на доступных и даже бесплатных субстратах – отходах различных видов промышленности, наиболее безопасной из которых (для потребителей) является пищевая промышленность. Таким образом, цель нашей работы – поиск быстро растущих грибов, приносящих пользу, а также безопасных субстратов, которые могут поддерживать быстрый рост и эффективное производство биологически активных веществ. Цель данного исследования – оценка возможностей высоко ценимого гриба *Ganoderma lucidum*, культивируемого на хлебной крошке.

Штамм *G. lucidum 1900* получен из коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники им. Н.Г. Холодного НАНУ. В качестве субстрата использовали отходы производства хлеба – хлебную крошку (г. Киев, хлебокомбинат № 12). Субстрат стерилизовали в автоклаве 60 мин. при давлении 1 атм. Мицелий выращивали глубинным способом в колбах с концентрацией хлебной крошки 50 г/л. В качестве посевного материала использовали гомогенизированный мицелий. Показатели роста культуры определяли на 3-и, 6-е, 9-е, 12-е и 15 сутки. Контролем служила среда, не засеянная грибом. Мицелий отделяли от культуральной жидкости путем фильтрации, сушили при 105° С до постоянного веса. Редуцирующие вещества в культуральной жидкости определяли феррицианидным методом. Концентрацию сухих веществ исследовали на ореометре, pH – на pH-метре. Экзополисахариды определяли весовым методом.

Результаты проведенных исследований показали, что концентрация биомассы *G. lucidum* наиболее значительно увеличивалась до 3-го дня (с 0, 002 г/л посевного до 6,71±0,1 г/л), а также с 3-го по 6-ой день (до 15,22±0,2 г/л). С 6-го по 9-й день наблюдалось снижение концентрации биомассы (до 13,53±0,2 г/л), а далее постепенное увеличение концентрации биомассы: на 12-й день до 15,05±0,2 г/л, а на 15-й до 18,10±0,2 г/л.

Характер динамики концентрации редуцирующих веществ в культуральной жидкости также имел 2 пика: содержание редуцирующих веществ до 3-го дня увеличивалось (с 5,54±0,2 г/л в контроле до 12,63±1,0 г/л), до 6-го дня значительно уменьшилось (до 1,48±0,1 г/л), а потом резко увеличилось (до 15,19±1,5 г/л на 12-й день и 15-й день культивирования). По-видимому, первоначальное увеличение содержания редуцирующих веществ связано с разложением субстрата грибом. В дальнейшем *G. lucidum* утилизировала редуцирующие вещества, поэтому их концентрация снижалась. Параллельно с этим повышалась концентрация биомассы, однако к 9-му дню концентрация биомассы снизилась, а концентрация редуцирующих веществ немного возросла, что, вероятно, связано с началом разложения более сложно доступных веществ. В дальнейшем содержание редуцирующих веществ значительно повысилось, и концентрация биомассы также стала возрастать, потому что появился доступный субстрат.

Концентрация сухих веществ в культуральной жидкости на 3-й день была немного ниже (43,5±0,0 г/л), чем в контроле со средой без гриба (42,2±1,3 г/л), на 6-ой немного уменьшилась (30,5±0,0 г/л), далее была на том же уровне на 9-й и 12-й день, но снова уменьшилась на 15-й день (17,5±0,1 г/л). Уменьшение концентрации сухих веществ происходило параллельно с уменьшением объема культуральной жидкости и увеличением объема биомассы. Можно сказать, что гриб утилизировал питательные вещества крошки из жидкости.Кислотность контрольной среды без гриба (6,01±0,2) была немного ниже pH водопроводной воды (6,65±0,01), на которой была основана. pH культуральной жидкости до 3-го дня значительно снижалась (4,4±0,2), до 6-го дня снижалась почти на единицу (3,61±0,0), до 9-го дня снижалась (3,21±0,1), а далее немного возрастала к 12-му (3,44±0,1) и 15-му (3,56±0,0) дням.

Концентрация экзополисахаридов *G. lucidum* в культуральной жидкости на 6-й день составляет 1,79±0,1 г/л. Далее количество экзополисахаридов значительно увеличиваются к 9-му дню (4,84±0,3 г/л), остается приблизительно на том же уровне на 12-й (4,69±0,1) и увеличивается к 15-му (5,19±0,3 г/л). На первых этапах культивирования концентрация экзополисахаридов резко увеличивалась параллельно с накоплением биомассы, далее оставалась стабильной, так как количество биомассы не увеличивалось, а к 15-му дню концентрация экзополисахаридов опять стала возрастать, как и концентрация биомассы.

Впервые показана возможность глубинного культивирования лекарственного гриба *G. lucidum* на среде, основанной на хлебной крошке. Установлена способность изучаемого вида к биосинтезу экзополисахаридов на субстрате с дешевыми отходами производства хлеба.

SCREENING OF BASIDIOMYCETES – PRODUCENTS OF IMPORTANT BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES CULTIVATED ON THE PLANT WASTES OF FOOD INDUSTRY

[1]Ivanova T.S., [1] Bisko N.A., [1]Barshteyn V.Yu., [1]Krupodorova T.A., [2]Antonenko L.A., [3]Megalinska A.P.

[1] Institute of food biotechnology and genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: ivanova_tatiana_wat2@bigmir.net
[2] National Technical University of Ukraine "KPI", Kiev, Ukraine
[3] National Pedagogical N.P. Dragomanov University, Kiev, Ukraine

Mushrooms have been used for their medicinal values in ancient medicine, and in modern times are being investigated as herbal medicines for their "magical" therapeutic properties in the combat against cancer, hepatitis, AIDs, and high cholesterol. At the same time mushroom enzymes are used in bioremediation, paper industry, in preparation of cheese, for making feed more available for domestic animals and so on. Healthy nutrition and diet are gaining importance, and mushrooms could be an efficient part of it since they are rich in protein, very low in simple carbohydrates, rich in dietary fiber, high in antioxidants, and very low in fat. So it can be inferred that mushrooms are important source of biologically active substances. Fortunately, we can grow mushrooms on the affordable and even free of charge substrates – wastes of different industries, the most safety of which (for consumers) is food industry. Thus, the goal of our work is to find useful quickly growing mushrooms and chip not harmful substrates that can support fast growth and effective production of biologically active substances. The purpose of this study is evaluating the potential of highly ranked beneficial mushroom – *Ganoderma lucidum,* which was cultivated on the bread crumbles.

The strain *G. lucidum 1900* was obtained from the Culture Collections of Mushrooms (IBK) of M.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Science of Ukraine. We used wastes of bread production – bread crumbles as a substrate (from bread-baking plant № 12, Kiev). The substrate was sterilized in the autoclave during 60 min. with pressure of 1 atm. Mycelium was grown in submerged culture in retort with concentration of bread crumbles 50 g/l. We used homogenized mycelium as an inoculum. The growth parameters was evaluated on the 3-d, 6-th, 9-th, 12-th, and 15-th days. A substrate without inoculum was used as a control. Mycelium was separated from cultural broth by filtration, dried on 105° C. The concentration of reducing substances was evaluated by ferricianid method. The concentration of dry matter was analyzed by oreometer, pH was defined on pH-meter. Exopolysaccharides was studied with weight method.

The results of our investigations shown than the concentration of the biomass of *G. lucidum* the most strongly increased on the 3-d day (from 0,002 g/l of inoculum to 6,71±0,1 g/l), and from 3-d to 6-th day (to 15,22±0,2 g/l). From 6-th to 9-th day there was a decrease of biomass concentration (to 13,53±0,2 g/l), and then progressive increasing: on the 12-th day to 15,05±0,2, on the 15-th to 18,10±0,2 g/l.

The character of reducing substances dynamic in cultured broth had 2 peaks: reducing substances content augmented on the 3-d day (from 5,54±0,2 g/l in control to 12,63±1,0 g/l), on the 6-th day it significantly decreased (to 1,48±0,1 g/l), then considerably increased to 15,19±1,5 g/l on the 12-th day, and 15-th day of cultivation.

As we can see, fist increasing of reducing substances content is connected to decomposition of substrate by mushroom. Further *G. lucidum* utilized reducing substances, that's why their concentration decreased. It could be drown a parallel between their decreasing and augmentation of biomass concentration. But on the 9-th day biomass concentration decreased, and reducing substances concentration increased, which can be connected with the beginning of more hardly accessible substances degradation. Later reducing substances content has considerably increased, and biomass concentration has increased also, because of accessible substrate appearance.

The dry matter concentration in cultural broth was significantly lower on the 3-d day (43,5±0,0 g/l) then in a control with substrate without mushroom (42,2±1,3 г/л), slightly decreased on the 6-th day (30,5±0,0 г/л), and then was at the same level on the 9-th and 12-th day, but decreased again on the 15-th day of cultivation (17,5±0,1 g/l). Diminution of dry matter concentration occurred parallel with diminution of cultural broth volume and augmentation of biomass volume. One can say that mushroom utilized nutrients of bread crumbles from the liquid.

Control substrate acidity without mushroom (6,01±0,2) was a little less than pH of top water (6,65±0,01) which was it basis. Cultural broth pH considerably decreased on the 3-d day (4,4±0,2), and decreased almost by one point on the 6-th day (3,61±0,0), it was continuing to drop on the 9-th day (3,21±0,1), then had a little augmentation on the 12-th (3,44±0,1) and 15-th (3,56±0,0) days.

G. lucidum exopolysaccharide concentration in a cultural broth on the 6-th day is 1,79±0,1 г/л. Futher exopolysaccharide amount considerably increases on the 9-th day (4,84±0,3 г/л), remains approximately at the same level on the 12-th (4,69±0,1), and increasing on the 15-th (5,19±0,3 г/л) days. On the first stages of mushroom cultivation exopolysaccharide concentration significantly increased parallel with biomass accumulation, then it stays stabile since biomass amount didn't increase, and on the 15-th day exopolysaccharide concentration started to increase again as biomass concentration.

For the first time was shown an opportunity of medicinal mushroom *G. lucidum* in submerged culture on the substrate, based on the bread crumbles. Our team established the ability of exopolysaccharide biosynthesis for species under study on the substrate based on the chip wastes of bread production.

АНТИСЕПТИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ НАНОАКВАХЕЛАТОВ МЕТАЛЛОВ НА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ ДУБОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Каплуненко В.Г., Аретинская Т.Б., Трокоз В.А., Косинов М.В., Максин В.И.

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, Украина
e-mail: tassar@bigmir.net

Одним из актуальных вопросов лесного шелководства является разработка и внедрение новых способов повышения жизнеспособности и продуктивности дубового шелкопряда. В качестве эффективных и экологически безопасных дезинфектантов и лечебно-профилактических средств могут быть использованы карбоксилированные наночастицы металлов. В процессе зимовки и инкубации коконов дубового шелкопряда моновольтинной породы Полесский тасар проводили отбор и учет погибших куколок, а в период папильонажа – анализ бабочек на возбудителей заболеваний. Антисептические свойства наноаквахелатов металлов Ag, Cu, Mg и их комбинаций Ag+Cu и Ag+Cu+Mg в разных концентрациях изучали микробиологическими методами. Анализ биологических показателей насекомых проводили согласно общепринятым методикам. В результате проведения выкормок гусениц и бактериологического контроля выделены грамположительные неспоровые палочки из рода *Bacillus*, а также грамотрицательные неспоровые палочки родов *Pseudomonas* и *Proteus* и некокковые формы.

Впервые исследована бактерицидная и фунгицидная активность наноаквахелатов металлов по отношению к энтомопатогенным штаммам, вызывающим гибель шелкопряда в процессе его выращивания. Наивысшие показатели имел наноаквахелат Ag+Cu («Шумерское серебро»). Зона задержки роста бактерий была 10–12 мм, а грибов – 6–10 мм при разведении 1:1:4. При использовании большего разведения указанная зона постепенно сужалась и имела диаметр соответственно 5–8 и 3–7 мм. Дезинфицирующая активность наноаквахелата серебра была несколько ниже в сравнении с комплексом Ag+Cu, но зона задержки роста микроорганизмов при использовании минимального разведения препарата (1:5) составляла соответственно 6–10 и 6–8 мм. Рост грибов значительно подавлял наноаквахелат меди (4–6 мм). Отмечена не высокая, но достоверная активность наноаквахелата магния (зоны ингибирования роста бактерий были в пределах 4–6, 3–4 и 2–3 мм в зависимости от степени разведения препарата).

В результате выкормки гусениц из выбракованной грены, обработанной наноаквахелатами, установлено, что максимальной была смертность насекомых контрольного варианта (22,8% – от бактериальной и 26,0% – от грибной инфекции, выход здоровых бабочек – в пределах 40,0%, шелконосность – 6,2%). При обработке грены исследуемыми наноаквахелатами биологические показатели гусениц значительно улучшились и снизился уровень их смертности. В первую очередь это касается комплекса Ag+Cu. При использовании разведений Ag:Cu:H_2O = 1:1:4 и 1:1:9 больных гусениц не было. В этом случае наблюдали и максимальный выход здоровых коконов – 94,9–95,1%, а их шелконосность достигала 10,0–10,5%. Смертность гусениц оказалась незначительной также при обработке грены наносеребром (количество сортовых коконов в данном варианте – 80,0–82,2% при шелконосности 8,9–9,2%). Высокую фунгицидную активность проявил наноаквахелат меди, обработка которым грены способствовала полному сохранению гусениц при разведении водой 1:5 и 1:10. Количество сортовых коконов при этом достигало 79,2%. Положительное влияние при обработке грены оказал наноаквахелат магния. Он имел более низкую, чем Ag+Cu, дезинфицирующую активность, но стимулировал выход здоровых коконов и обусловил высокие показатели шелкопродуктивности – 9,9–10,2%.

Анализ отдельных партий бабочек-самок показал, что из них 14,0% были больными и отложили зараженные кладки. Изучение влияния на выкормках гусениц шелкопряда из потенциально инфицированной грены наиболее эффективного наноаквахелата Ag+Cu+Mg по отношению к энтомопатогенным штаммам микроорганизмов подтвердило его высокую бактерицидную и фунгицидную активность. Благодаря этим свойствам наноаквахелат Ag+Cu+Mg при разведении водой в соотношении 1:50 и 1:100 обеспечил при обработке корма уничтожение болезнетворных микроорганизмов в ослабленных бактериозом и микозом гусеницах I–III возраста. Внесение препарата в корм способствовало снижению смертности гусениц и куколок за период выкормки соответственно 18,1 и 25,0% против контроля. Нанокарбоксилат серебра оздоровлял популяцию насекомых, стимулируя рост гусениц. Это положительно повлияло на хозяйственно-ценные показатели дубового шелкопряда. Средняя масса кокона возросла на 7,7%, масса шелковой оболочки – на 1,8% относительно контрольного варианта.

Таким образом, наноаквахелаты металлов могут защитить гусениц дубового шелкопряда на выкормках от распространения инфекции, передающейся контактным путем или через экскременты зараженных насекомых. Наивысшая бактерицидная и фунгицидная активность к возбудителям заболеваний шелкопряда присуща наноаквахелату Ag+Cu («Шумерское серебро»). Несколько ниже была зона угнетения роста микроспоридий при применении наноаквахелатов Ag, Cu, Mg или при их совместимом использовании. Применение наноаквахелатов Ag+Cu, Ag, Cu, Mg в качестве антисептиков грены дубового шелкопряда позволило вдвое снизить уровень заболеваемости насекомых, увеличить количество и улучшить качество коконов. Экспериментально установлено, что наноаквахелат Ag+Cu+Mg значительно оздоровляет популяцию ослабленных бактериозами и микозами полезных насекомых, уменьшает гибель гусениц и улучшает хозяйственно-ценные показатели дубового шелкопряда. Описанные в этом сообщении положительные результаты являются основанием для проведения исследований наноаквахелатов, полученных по методу Каплуненко-Косинова, с целью использования в животноводстве, ветеринарной и гуманной медицине.

METALS NANOAQUAHELATS INFLUENCE ON DISEASES ORIGINATORS BY ANTHERAEA PERNYI G.-M.

Kaplunenko V.G., Aretinska T.B., Trokoz V.A., Kosinov M.V., Maksin V.I.

National university of live and environmental science of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: tassar@bigmir.net

One of pressing questions forest sericulture is working out and introduction of new ways of rising of viability and productivity of oak silkworm. As effective and ecologically safe disinfectants and treatment-and-prophylactic agents can be used hydrated metals nanoaquahelats. In the hibernation and an incubation of cocoons of oak silkworm monovoltine breeds Tassar of Polissya led selection and the account of the lost chrysalides, and during the papiliotage period – the analysis of butterflies on originators of diseases. Antiseptic properties Ag, Cu, Mg metals nanoaquahelats and their combinations Ag+Cu («Sumer silver») and Ag+Cu+Mg in different concentration microbiological methods studied. The analysis of insect's biological indicators spent according to the standard techniques. As a result of carrying out caterpillar's rearing and bacteriological control Gram-positive not sporous rods from sort *Bacillus*, and also Gram-negative not sporous rods of sorts *Pseudomonas* and *Proteus* and not coccal forms are allocated.

For the first time bactericidal and fungicidal activity nanoaquahelats metals in relation to entomopathogenic strains causing destruction of a silkworm in the course of its rearing is investigated. The highest indicators had Ag+Cu nanoaquahelat. The zone of a growth inhibition of bacteria was 10–12 mm, and mushrooms – 6–10 mm at delution 1:1:4. At use of larger delution the specified zone gradually was narrowed and had diameter accordingly 5–8 and 3–7 mm. Disinfectant activity nanoaquahelat was slightly more low in comparison with complex Ag+Cu, but the zone of a growth inhibition of microorganisms at use of the minimum delution of a preparation (1:5) made accordingly 6–10 and 6–8 mm. Growth of mushrooms considerably suppressed copper nanoaquahelat (4–6 mm). Authentic activity magnesium nanoparticles (zones of inhibition of growth of bacteria were within 4–6, 3–4 and 2–3 mm depending on degree of delution of a preparation) isn'ted not high, but.

As a result caterpillars rearing from cullinge grain, processed nanoliquids, it is established that the mortality of insects of a control variant (22,8 % – from bacteriemic and 26,0 % – from a mushroom infection, an exit of healthy butterflies – within 40,0 %, silk ratio – 6,2 %) was maximum. At processing grain investigated nanoaquahelats biological indicators of caterpillars level of their mortality has considerably improved and has decreased. First of all it concerns complex Ag+Cu. At use of delutions Ag:Cu:H2O = 1:1:4 and 1:1:9 sick caterpillars weren't. In this case observed also the maximum exit of healthy cocoons – 94,9–95,1 %, and them silk ratio reached 10,0–10,5 %. The mortality of caterpillars has appeared insignificant also at nanosilver grain processing (quantity of high-quality cocoons in the given variant – 80,0–82,2 % at silk ratio 8,9–9,2 %). High fungicidal activity has shown copper aquahelat, processing which grain promoted full conservation of caterpillars at use of delutions by water 1:5 and 1:10. The quantity of high-quality cocoons in this case reached 79,2 %. Positive influence at processing grain has rendered magnesium aquahelat. It had lower, than Ag+Cu, disinfectant activity, but the exit of healthy cocoons stimulated and has caused high indicators silk ratio – 9,9–10,2 %.

The analysis of job lots of butterflies-females has shown that from them of 14,0 % were patients and have postponed the infected ovipositions. Influence studying on caterpillars silkworm cultivations from potentially infected grain the most effective Ag+Cu+Mg nanoaquahelat in relation to entomopathogenic to strains of microorganisms has confirmed its high bactericidal and fungicidal activity. Thanking these properties Ag+Cu+Mg nanoaquahelat at delution by water in the ratio 1:50 and 1:100 has provided at processing of a forage destruction of pathogenic microorganisms in weakened by a bacteriosis and a mycosis caterpillars I–III age. Entering of a preparation into a forage promoted depression of a mortality of caterpillars and dolls for the period cultivation accordingly 18,1 and 25,0 % against control. Silver nanocarboxylate population of insect's sanitate, stimulating caterpillars growth. It has positively affected economic-valuable indicators of an oak silkworm. The average mass of a cocoon has increased on 7,7 %, mass of a silk cover – on 1,8 % concerning a control variant.

Thus, metals nanoaquahelas can protect caterpillars of oak silkworm on cultivations from diffusion of the infection transferred by contact way or through excrement of infected insects. The highest bactericidal and fungicidal activity to silkworm diseases originators is inherent Ag+Cu nanoaquahelat («Sumer silver»). There was a zone of oppression of microsporidia growth at application Ag, Cu, Mg nanoaquahelats or at their compatible use slightly lower. Application Ag+Cu, Ag, Cu, Mg nanoaquahelats as antiseptics grain an oak silkworm has allowed to lower twice level of disease of insects, to enlarge quantity and to improve quality of cocoons. It is experimentally established that Ag+Cu+Mg nanoaquahelat it is appreciable sanitate population weakened by bacterioses and mycoses of useful insects, reduces destruction of caterpillars and improves economic-valuable indicators of an oak silkworm. The received positive takes are the basis for carrying out of nanopreparations researches, received by Kaplunenko-Kosinov, for the purpose of use in animal industries, veterinary and humane medicine.

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ СИНТЕЗА ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* ІМВ В-7241

Конон А.Д., Билец И.В., Антонюк С.И., Пирог Т.П.

Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина
e-mail: KononA@meta.ua

Микробные поверхностно-активные вещества (ПАВ) являются относительно новым продуктом биотехнологии, а наиболее перспективной отраслью их использования является фармацевтическая промышленность и медицина, что обусловлено уникальными физико-химическими (способность к снижению поверхностного и межфазного натяжения, эмульгированию) и биологическими (нетоксичность, высокая антимикробная, антивирусная и иммуномодулирующая активность) свойствами этих метаболитов [1, 2]. Кроме того, микробные ПАВ обладают антиадгезивными свойствами [3], а также способностью к формированию липосом, которые способны селективно переносить лекарства к органу-мишени [4].

В предыдущих исследованиях нами было показано, что штамм *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, изолированный из загрязненных нефтью образцов почвы, синтезирует поверхностно-активные вещества при выращивании на гидрофильных и гидрофобных субстратах. Установлены условия культивирования штамма ІМВ В-7241 на этаноле, обеспечивающие максимальные показатели синтеза ПАВ [5].

Цель данной работы – усовершенствование технологии синтеза ПАВ *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241.

Исследование влияния внешних факторов на синтез ПАВ позволили увеличить выход целевого продукта в 1,5–6 раз. Установлено, что одновременное внесение фумарата (0,01 %, предшественник глюконеогенеза) и цитрата (0,01 %, регулятор синтеза липидов) в конце экспоненциальной фазы роста штамма ІМВ В-7241 на среде с этанолом сопровождалось увеличением количества синтезированных ПАВ на 195 % по сравнению с показателями синтеза на среде без органических кислот. Повышение синтеза ПАВ в присутствии фумарата и цитрата обусловлено увеличением в 1,7–7 раз активности ферментов биосинтеза гликолипидов (фосфоенолпируватсинтетазы и трегалозофосфатсинтазы) и аминолипидов (НАДФ$^+$-зависимой глутаматдегидрогеназы), а также одновременным функционированием двух анаплеротических путей (глиоксилатного цикла и фосфоенолпируваткарбоксилазной реакции).

Культивирование *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на смеси энергетически избыточного (гексадекан) и энергетически дефицитных (глицерин, глюкоза, этанол) ростовых субстратов позволило увеличить в 1,5–4,8 раз концентрацию ПАВ по сравнению с выращиванием на моносубстратах. Изучение влияния способа подготовки посевного материала показало, что максимальный синтез ПАВ на смеси гексадекана и глицерина наблюдался при использовании инокулята, выращенного на гексадекане, а на смеси гексадекана и глюкозы, гексадекана и этанола – на соответствующих смешанных субстратах. Установлена зависимость синтеза ПАВ от концентрации субстратов и их молярного соотношения в смеси. Теоретический расчет энергетических потребностей синтеза биомассы и поверхностно-активных трегалозомиколатов *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 позволил установить, что оптимальным для синтеза ПАВ является молярное соотношение концентраций гексадекана и глицерина 1:6. Эксперименты подтвердили теоретические расчеты и показали, что в таких условиях культивирования показатели синтеза ПАВ повышались на 200−375 % по сравнению с таковыми на соответствующих моносубстратах.

Внесение 0,1 мМ Cd^{2+} и Pb^{2+} в среду с этанолом сопровождалось увеличением показателей синтеза ПАВ на 100–360 % по сравнению с культивированием на среде без металла. Внесение в питательную среду 0,1–0,5 мМ катионов меди приводило к увеличению концентрации ПАВ всего на 10 %, однако при пересеве *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на среду без Cu^{2+} показатели синтеза ПАВ увеличивались на 300–600 % по сравнению с использованием инокулята, выращенного на среде без Cu^{2+}.

Таким образом, полученные результаты могут быть использованы для повышения эффективности технологи микробных поверхностно-активных веществ.

Литература:

1. *Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R.* Biosurfactants: potential applications in medicine // J. Antimicrob. Chemother. – 2006. – V. 57, № 4. – P. 609–618.
2. *Singh P., Cameotra S.* Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences // Trends in Biotechol. – 2004. – V. 22, № 3. – P. 142–146.
3. *Rodrigues L.R., Banat I.M., van der Mei H.C. et al.* Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnosolipid biosurfactants // J. Appl. Microbiol. – 2006. – V. 100, № 3. – P. 470–480.
4. *Igarashi S., Hattori Y., Maitani Y.* Biosurfactant MEL-A enhances cellular association and gene transfection by cationic liposome // J. Controll. Releas. – 2006. – V. 112, № 3. – P. 362–368.
5. *Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А.* Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т.45, № 3. – С. 304–310.

INTENSIFICATION OF SURFACTANTS SYNTHESIS BY *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241

Konon A.D., Bilets I.V., Antonyuk S.I., Pyrog T.P.

National University Food Technologies, Kyiv, Ukraine
e-mail: KononA@meta.ua

Microbial surface-active substances (SAS, surfactants) are among rather new biotechnological products. The most perspective fields of their use are pharmaceutical industry and medicine, because biosurfactants have unique physical and chemical properties (the ability to decrease the surface and interfacial tense and to emulgate substrates) and also biological properties (low toxicity, high antimicrobial, antiviral and immune modulating activity) [1, 2]. Besides microbial surfactants have antiadhesive properties [3], and also are able to form liposomes, that can selectively transfer medicine to the target organs [4].

Our previous investigations showed that strain *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, isolated from oil polluted soil samples, showed ability to synthesize surfactants while growing on hydrophilic and hydrophobic substrates. The cultivating conditions of IMB B-7241 strain on ethanol were determined and led to the highest indexes of surfactant synthesis [5].

The aim of present study is to improve of *A. calcoaceticus* IMB B-7241SAS technology

By investigation of external factors influence on SAS synthesis the quantity of final product was increased in 1.5-6 times. It was determined that the addition of both fumarate (0.01 %, the precursor of gluconeogenesis) and citrate (0.01 %, the regulator of lipid synthesis) to the media with ethanol in the end of exponential growth phase of IMB B-7241 caused the increasing of SAS quantity: 195 % more that on the media without organic acids. The increasing of SAS synthesis in presence of fumarate and citrate was caused by increasing in 1.7-7 times of activity of enzymes that catalyze biosynthesis of glycolipids (phosphoenolpiruvatesynthetase and trehalosephosphatesynthase) and aminolipids ($NADP^+$-depended glutamatedehydrogenase), and also by function of two anaplerotic ways (glyocsilate cycle and phosphoenolpiruvatecarboxylase reaction).

Cultivating of *A. calcoaceticus* IMB B-7241 on the mixed energy reach (hexadecane) and energy deficit (glycerol, glucose, ethanol) substrates increased the surfactants concentration in 1.5-4.8 times then cultivating on monosubstrates. The study of the inoculate preparation showed that the highest surfactant synthesis was observed on both hexadecane and glycerol when the inoculate was grown on hexadecane. The best inoculate for surfactant synthesis on mixtures of hexadecane + glucose and hexadecane + ethanol was the one got on the respective mixed substrates. The surfactant synthesis was depended on concentration of substrates and their molar ratio in the mixture. The theoretical calculation of energy requirement for production of *A. calcoaceticus* IMB B-7241 biomass and surface active trehalosemicolates showed the optimal parameters for SAS synthesis: the molar ratio between hexadecane and glycerol as 1:6. The experiments confirmed the theoretical calculation and showed that such cultivating conditions the indexes of surfactant production increased in 200-375 % when compared with those on monosubstrates.

The addition of Cd^{2+} and Pb^{2+} (0.1 mM) into the media with ethanol caused the increasing of surfactants synthesis indexes in 100-360 % when compared with the cultivating on the media without metal. At the same time the addition of 0.1-0.5 mM of copper ions into the nutrition media caused only 10 % decreasing of surfactant concentration. But after inoculating of *A. calcoaceticus* IMB B-7241 into the media without Cu^{2+} the surfactant synthesis indexes increased up to 300-600 % when compared with the inoculate grown on media without Cu^{2+}.

So the results of present research can by used for increasing of biosurfactants technology effectiveness

References:

1. *Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R.* Biosurfactants: potential applications in medicine // J. Antimicrob. Chemother. – 2006. – V. 57, № 4. – P. 609–618.
2. *Singh P., Cameotra S.* Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences // Trends in Biotechol. – 2004. – V. 22, № 3. – P. 142–146.
3. *Rodrigues L.R., Banat I.M., van der Mei H.C. et al.* Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnosolipid biosurfactants // J. Appl. Microbiol. – 2006. – V. 100, № 3. – P. 470–480.
4. *Igarashi S., Hattori Y., Maitani Y.* Biosurfactant MEL-A enhances cellular association and gene transfection by cationic liposome // J. Controll. Releas. – 2006. – V. 112, № 3. – P. 362–368.
5. *Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А.* Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т.45, № 3. – С. 304–310.

БІОСУРФАКТАНТИ ЯК НОВІ БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ

Конон А.Д., Софілканич А.П., Скочко А.Б., Пирог Т.П.

Національний університет харчових технологій, Київ, Україна
e-mail: KononA@meta.ua

Завдяки амфіфільній будові молекул мікробним поверхнево-активним речовинам (ПАР), або біосурфактантам притаманні різноманітні властивості, що зумовили їхнє використання у нафто- та гірничодобувній, хімічній, харчовій промисловості, сільському господарстві, а також у природоохоронних технологіях для очищення довкілля [1, 2]. Іншим перспективним напрямком практичного застосування мікробних ПАР є медицина. На сьогодні цей напрям лише починає розвиватися, але вже є певні позитивні результати, що дають змогу розглядати ПАР мікробного походження як альтернативу синтетичним лікарським засобам. Завдяки антимікробним, антивірусним і антиадгезивним властивостям мікробні ПАР можуть бути використані як безпечні та ефективні терапевтичні засоби [3, 4].

У попередніх дослідженнях із забруднених нафтою зразків ґрунту і води нами було виділено нафтоокиснювальні бактерії, ідентифіковані як *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 і *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 і встановлено здатність цих штамів синтезувати метаболіти з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями під час росту на різних гідрофобних і гідрофільних субстратах.

Мета даної роботи – дослідження антимікробних властивостей та антиадгезивної активності поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ЕК-1 і *A. calcoaceticus* К-4. Як препарати ПАР використовували стерильний супернатант культуральної рідини.

Найбільший антимікробний вплив досліджуваних ПАР спостерігався щодо тест-культури *Bacillus subtilis* ВТ-2. За присутності ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 у концентрації 0,98 мг/мл спостерігали загибель понад 90 % клітин тест-культури уже через годину експозиції; присутність ПАР *A. calcoaceticus* К-4 (0,22 мг/мл) забезпечувала 100 % загибель клітин *B. subtilis* БТ-2 незалежно від тривалості обробки. Доведено, що антимікробний вплив ПАР *A. calcoaceticus* К-4 щодо *B. subtilis* БТ-2 залежить від фізіологічного стану тест-культури, причому препарати ПАР ефективніше діяли на спорову культуру (зниження виживання клітин на 75 % через 2 год експозиції), ніж на вегетативні клітини (на 47 % через 2 год).

Встановлено, що кількість клітин *Candida tropicalis* ПБТ-5 за присутності ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 знижувалася на 80 % із підвищенням концентрації ПАР до 1,44 мг/мл і тривалості обробки до 2 год. Виживання клітин *Candida albicans* Д-6 за обробки ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 (0,92 і 1,44 мг/мл) становило 26–33 і 44–47 % відповідно. Аналогічно, за присутності ПАР *A. calcoaceticus* К-4 кількість живих клітин *C. albicans* Д-6 збільшувалася від 71 % до 89 % з підвищенням концентрації ПАР від 0,15 мг/мл до 0,22 мг/мл. Отже, для даної тест-культури найвища з досліджуваних концентрації ПАР виявилась менш ефективною.

Показано, що ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 (0,98–1,47 мг/мл) не проявляли антимікробної дії щодо *Escherichia coli* ІЕМ-1 та *Saccharomyces cerevisiae* ОБ-3, тоді як препарати *A. calcoaceticus* К-4 за концентрації 0,22 мг/мл значно знижували виживання цих тест культур: *E. coli* ІЕМ-1 – на 67 %, *S. cerevisiae* ОБ-3 – на 48 %.

Наступні дослідження показали, що ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 посилювали антимікробну дію олії чайного дерева на певні мікроорганізми *(C. albicans* Д-6, *Aspergillus. niger* Р-3, *Staphylococcus aureus* БМС-1) завдяки власним як антимікробним, так і емульгувальним властивостям. Встановлено, що за одночасного внесення у суспензію досліджуваних тест-культур (10^4–10^5 клітин/мл) емульсії на основі олії чайного дерева (12,5 мкл/мл) і ПАР (0,43 мг/мл) кількість живих клітин через 15 хв експозиції була на 0,7–66 % нижчою, ніж у разі обробки суспензії мікроорганізмів препаратами олії без поверхнево-активних речовин.

Крім того встановлено, що препарати ПАР *A. calcoaceticus* К-4 у концентрації 0,28 мг/мл зменшували кількість прикріплених клітин добової культури *B.subtilis* БТ-2 на пластинках кафелю на 41,3 % і лінолеуму на 82,4 %, *E. coli* ІЕМ-1 – на пластинках сталі на 41 %, пластику на 15 % і кафелі на 14 %. Показано, що антиадгезивна антивність препаратів ПАР залежала від фізіологічного стану клітин *B. subtilis* БТ-2, причому показники прикріплення знижувалися із збільшенням віку культури.

Таким чином, мікробні поверхнево-активні речовини можуть бути потенційними біологічно активними речовинами із антимікробними та антиадгезивними властивостями.

Література:

1. *Banat I.M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M.G., Fracchia L., Smyth T.J., Marchant R.* Microbial biosurfactants production, application and future potential // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 87, № 2. – P. 427–444. 18.
2. *Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P.* Surfactants in microbiology and biotechnology. Part 2. Applications aspects // Biotechnol. Adv. – 2007. – Vol. 25, № 1. – P. 99–121.
3. *Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R.* Biosurfactants: potential applications in medicine // J. Antimicrob. Chemother. – 2006. – Vol. 57, № 4. – P. 609–618.
4. *Singh P., Cameotra S.* Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences // Trends in Biotechol. – 2004. – Vol. 22, № 3. – P. 142–146.

BIOSURFACTANTS ARE NEW BIOLOCIALLY ACTIVE SUBSTANCES

Konon A.D., Sofilkanych A.P., Skochko A.B., Pyrog T.P.

National University Food Technologies, Kyiv, Ukraine
e-mail: KononA@meta.ua

Due to the amphiphilic structure of molecules of microbial surface-active substances (SAS, biosurfactants), they have different properties that cause their use in oil-extracting and mining industry, chemical and food industry, agriculture, and also in environment remediation technologies [1, 2]. Another perspective field of surfactants use is medicine. It is on the stage of active development now, but there is already positive results which show that biosurfactants can be a good alternative of synthetic medicine. Due to antimicrobial, antiviral and antiadhesive properties microbial SAS can be used in as effective medicine [3, 4].

In previous studies we isolated oiloxydazing bacteria from oil polluted samples of soil and water. They were identified as *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 and *Rhodococcus erythropolis* EK-1 which had ability to synthesize metabolites with surface active and emulsifying properties while growth on different hydrophobic and hydrophilic substrates.

The aim of present study is to investigate antimicrobial properties and antiadhesive activity of biosurfactants of *R. erythropolis* EK-1 and *A. calcoaceticus* K-4. The sterile supernatant of cultural liquid was used as a surfactant preparation.

The highest antimicrobial activity of investigated surfactants was observed against test-culture of *Bacillus subtilis* BT-2. The death of over 90 % of test-culture cells was shown in presence of surfactants of *R. erythropolis* EK-1 (in concentration of 0.98 mg/ml) after 1 hour of exposition; the addition of *A. calcoaceticus* K-4 surfactants (0.22 mg/ml) led to the 100 % death of *B. subtilis* BT-2 cells independent on time of treatment. It was shown that antimicrobial action of *A. calcoaceticus* K-4 surfactants against *B. subtilis* BT-2 depended on physiological state of test-culture. So surface-active preparations were more effective against spore culture (decreasing of quantity of living cells in 75 % after 2 hours of exposition) then against vegetative cells (decreasing ib 47% after 2 h).

It was determined that the quantity of *Candida tropicalis* PBT-5 cells in the presence of *R. erythropolis* EK-1 surfactants decreased on 80 % due to the increasing of surfactant concentration up to 1.44 mg/ml and time of treatment up to 2 h. After treatment with the surfactants of *R. erythropolis* EK-1 (0.92 and 1.44 mg/ml) the quantity of *Candida albicans* D-6 cell that stayed alive was 26-33 and 44-77 %, respectively. Similar results were got after treatment with the surfactants of *A. calcoaceticus* K-4. In this case quantity of living cells of *C. albicans* D-6 also increased from 71 % to 89 % due to the increasing of surfactant concentration fron 0.15 mg/ml to 0.22 mg/ml. So for investigated test-culture the higher concentration of surfactant showed to be less effective.

It was shown that surfactants of *R. erythropolis* EK-1 (0.98–1.47 mg/ml) didn't have antimicrobial activity against *Escherichia coli* IEM-1 and *Saccharomyces cerevisiae* OB-3, while the preparations of *A. calcoaceticus* K-4 in concentration of 0.22 mg/ml significant decreased living cells quantity of test-cultures: *E. coli* IEM-1 – on 67 %, *S. cerevisiae* OB-3 – on 48 %.

On the next stage of our investigations was determined that surfactants of *R. erythropolis* EK-1 amplify the antimicrobial action of manuka oil against some microorganisms (*C. albicans* D-6, *Aspergillus. niger* P-3, *Staphylococcus aureus* BMC-1) due to own antimicrobial anв emulsifying properties. When emulsion of manuka oil (12.5 mkl/ml) and surfactants (0.43 mg/ml) was added into test-cell suspension (10^4–10^5 cells/ml) it was shown that after 15 minutes of exposition quantity of living cells was 0.7-66.0% lesser then after addition of pure manuka oil.

It was also shown that *A. calcoaceticus* K-4 surfactants preparations in concentration of 0.28 mg/ml led to the decreasing of quantity of attached *B.subtilis* BT-2 (24 h culture) cells on glazed tile in 41.3 % and lino in 82.4 %. The decreasing of attached *E. coli* IEM-1 cells was: on metal plates in 41 %, on plastic in 15 % and on glazed tile in 14 %. It was shown that antiadhesive activity of surfactants preparations was depended on physiological state of *B.subtilis* BT-2 cells, and the attachment properties decreased with the increasing of age of culture.

Thus, microbial surfactants can be potential biologically active substances with antimicrobial and antiadhesive properties.

References:

1. *Banat I.M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M.G., Fracchia L., Smyth T.J., Marchant R.* Microbial biosurfactants production, application and future potential // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 87, № 2. – P. 427–444. 18.
2. *Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P.* Surfactants in microbiology and biotechnology. Part 2. Applications aspects // Biotechnol. Adv. – 2007. – Vol. 25, № 1. – P. 99–121.
3. *Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R.* Biosurfactants: potential applications in medicine // J. Antimicrob. Chemother. – 2006. – Vol. 57, № 4. – P. 609–618.
4. *Singh P., Cameotra S.* Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences // Trends in Biotechol. – 2004. – Vol. 22, № 3. – P. 142–146.

ПОДХОДЫ К ОПТИМИЗАЦИИ СХЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ИЗ МИКРОБНЫХ ИСТОЧНИКОВ

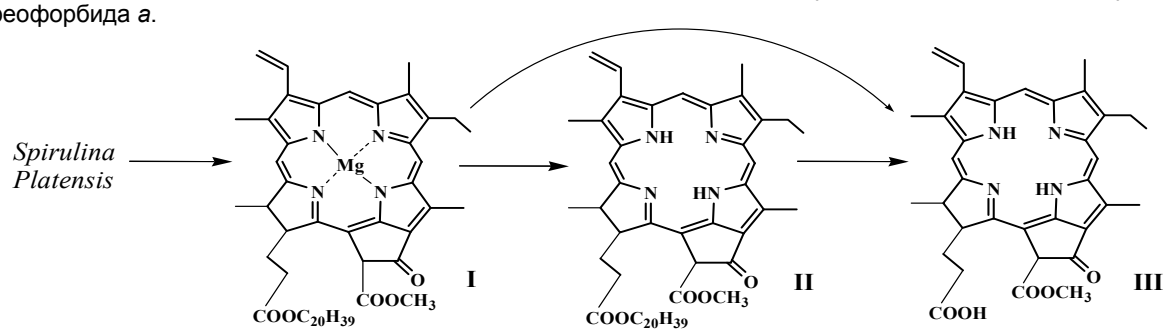
Ларкина Е.А., Ткачевская Е.П., Бородуля О.В., Аль-Окби Х.М., Семерня Л.Г., Гущина О.В., Лёвин А.А.

ГОУВПО Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В.Ломоносова; Москва, Россия
e-mail: elenatkachevskaya@yandex.ru

В последнее время ведётся активный поиск эффективных биопродуцентов для получения хлорофиллов в биотехнологическом процессе. Удобным природным нетоксичным веществом для получения фотосенсибилизаторов хлоринового ряда является хлорофилл *а*, который выделяют из растений и микроорганизмов. При дальнейшей модификации хлорофилла *а* в различных условиях получают такие соединения, как феофитин *а*, феофорбид *а*, хлорин e_6, пурпурин и другие их производные, в разной степени обладающие как гидрофобными, так и гидрофильными свойствами. Исходным соединением для химической модификации, чтобы придать хлоринам целевые свойства, в ряде случаев является феофорбид *а*. Поэтому актуально получение феофорбида *а* в чистом виде и с высоким выходом (из расчёта на исходное сухое природное сырьё). Как показал литературный поиск, в большинстве случаев природным источником для выделения фотосенсибилизаторов хлоринового ряда является микроорганизм *Spirulina,* поскольку в его клетках синтезируется только хлорофилл *а*, другие изомеры и производные хлорофилла в этом биопродуценте отсутствуют, что сокращает экономические затраты на выделение чистого пигмента.

В настоящей работе была поставлена задача выбора эффективной химической схемы получения феофорбида *а* исходя из природного (микробного) хлорофилла *а* и разработка соответствующей процессуальной схемы. Разработка подобных вопросов необходима как один из этапов составления технологического регламента при организации производства биологически активного или лекарственного вещества.

Феофорбид а (**III**) может быть получен в одну стадию при обработке органического экстракта хлорофилла *а* (**I**) кислотой (HCl) в таком количестве, которое достаточно и для удаления магния из координационной сферы тетрапиррольной системы, и для гидролиза сложноэфирной связи с высвобождением фитола. Второй вариант химической схемы предусматривает двустадийный процесс: на первой стадии в контролируемых кислых условиях происходит удаление магния из хлорофилла а, приводящее к образованию феофитина а (**II**) и выделению его в кристаллическом виде; на второй стадии проводят гидролитическое отщепление фитольного остатка от молекулы феофитина а и получение феофорбида *а*.



Исходя из более высокого выхода феофорбида *а* (0,47% в сравнении с 0,21% от сухой биомассы) и меньших усилий по хроматографической очистки промежуточных продуктов был выбран двухстадийный вариант химической схемы. В ходе работы было проведено шесть опытов (загрузка биомассы составляла от 20 до 200 г), где варьировали: условия предварительной обработки биомассы *Spirulina platensis* перед экстракцией; применяемые эктрагенты; метод физико-химической обработки полученного экстракта хлорофилла *а*. Перед экстракцией лиофилизованное сырьё подвергали предварительной промывке слабощелочным водным спиртом. Для интенсификации процесса экстракции применяли замораживание жидким азотом суспензии биомассы *Spirulina platensis* в экстрагенте, позволяющее разрушить клеточную стенку цианобактерий. При образовании мелкокристаллических осадков промежуточного и конечного продуктов заменяли фильтрование центрифугированием. Результатом настоящих исследований явилась процессуальная схема получения феофорбида *а* из органического экстракта хлорофилла *а* микробного биопродуцента *Spirulina platensis*, в результате модернизации процессуальной схемы удалось увеличить выход феофорбида *а* в 1,5 раза.

Работа выполнена при поддержке АВЦП "Развитие научного потенциала высшей школы" (№ 2.1.1/2889).

APPROACHES TO OPTIMIZATION OF THE PHOTOSENSITIZERS' LAYOUT OF PREPARING FROM MICROBIAL SOURCES

Larkina E.A., Tkachevskaya E.P., Borodulya O.V., Al-Okbi H.M., Semernya L.G., Gushchina O.V., Levin A.A.

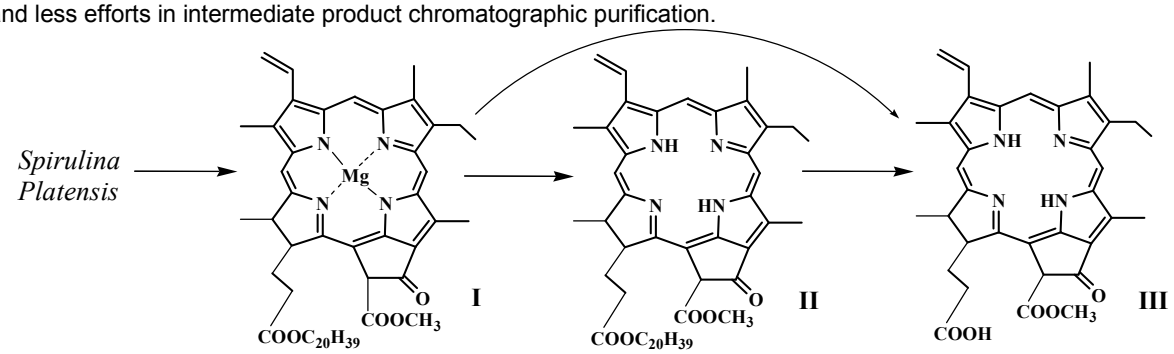
M.V. Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow. Russia
e-mail: elenatkachevskaya@yandex.ru

Recently in the biotechnological process an active search of effective bioproducents is being carried out to prepare chlorophylls. The most accessible natural non-toxic substance to prepare photosensitizers of chlorine series is chlorophyll *a* which is extracted from plants and microorganisms. If chlorophyll *a* is modified in a variety of conditions we can prepare such compounds as pheophytin *a,* pheophorbide *a,* chlorine e_6, purpurin and other their derivatives that possess both hydrophobic and hydrophilic properties. Pheophorbide *a* is in some instances the initial substance for chemical modification to impart chlorines to directed properties. That is why it is essential to isolate pheophorbide *a* in high-yields (based on dry raw material).

Literature search has shown that in most cases microorganism *Spirulina* is a natural source to prepare photosensitizers of chlorine series because its cells synthesize only chlorophyll *a*, there are no other isomers and chlorophyll derivatives in this bioproducent and we can cut down economic expenses on pure pigment isolation.

This work is aimed to choose an effective chemical scheme of pheophorbide *a* preparation from natural (microbic) chlorophyll *a* and to work out a relevant processual scheme. Treatment of these subjects is essential as it is one of the stages in process procedure formation in production engineering of biologically active or pharmaceutical substance.

Pheophorbide *a* (**III**) can be prepared in one stage by acidic (HCl) treatment of chlorophyll *a* (**I**) organic extract in amount needed for magnesium releasing from tetrapyrrole's system coordination sphere and for ester group hydrolysis with phytol releasing. The second variant of the chemical scheme provides for a two-stage process: on the first stage magnesium releases from chlorophyll *a* under controlled acidic conditions that leads to pheophytin *a* (**II**) formation and its isolation in crystal form; on the second stage phytyl is hydrolytically abstracted from pheophytin *a* molecule to get pheophorbide *a.* We have chosen the two-stage variant of the chemical scheme on the basis that there is the highest yield of pheophorbide *a* (0,47% comparing to 0,21%, based on of dry biomass) and less efforts in intermediate product chromatographic purification.



In the present work six experiments (biomass scale was from 20 to 200 g) were carried out with variations in: conditions of biomass *Spirulina platensis* preparative treatment before extraction; extraction agents applied; method of chlorophyll *a* extract physicochemical treatment. Lyophilized material was tentatively flushed by weak basic aqueous alcohol before the extraction. *Spirulina platensis* biomass suspension was liquid nitrogen freezed in extracting agent to stimulate the extraction process that allowed to damage the cyanobacteria cell wall. We applied centrifugation instead of filtration in case of fine-cristalline precipitates of intermediate and final product formation. The result of the present research is the processual scheme of pheophorbide *a* preparation proceeding from microbial bioproducent *Spirulina platensis* (its chlorophyll *a* organic extract), as a result of processual scheme modernization we managed to increase the yield of pheophorbide *a* in 1,5 times.

The research was supported in part by Grant № 2.1.1/2889 (AVCP "Razvitie nauchnogo potentciala vyshey shkoly")

ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ НА СИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ДВУХ ВИДОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

[1]Лёшина Л.Г., [1]Булко О.В., [2]Егоров О.А.

[1]Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: llioshina@ukr.net
[2]Химическая компания «СПОЛУКА», Киев, Украина

Уникальной способностью высших растений является синтез биологически активных соединений, которые активно используются человеком в различных сферах его жизнедеятельности. Для повышения синтеза вторичных метаболитов, наряду с традиционными методами селекции, используются методы генетического преобразования растений.

Одним из таких методов активации биосинтеза является трансформация растений Ri-плазмидой грамм-отрицательной почвенной бактерией *Agrobacterium rhizogenes*, в результате которой происходит разрастание растительных клеток, морфологически подобное корням (hairy roots). Для ряда растений показано, что Ri-трансформация изменяет их биохимические и морфологические показатели [1,2].

Нами представлена работа по агробактериальной трансформации двух лекарственных растений, наперстянки пурпурной (*Digitalis purpurea L.*) и барвника малого (*Vinca minor L.),* различными штаммами *A.rhizogenes*, получению из них культуры трансформированных корней, регенерации растений и сравнительному определению в них количества биологически активных веществ.

Наперстянка пурпурная *(Digitalis purpurea L.)* - травянистое двухгодичное растение из семейства Норичниковые *(Scrophulariaceae)*, содержащее около 60 гликозидов, многие из которых используются в качестве лекарственных препаратов, усиливающих и ускоряющих сокращения сердечной мышцы.

Барвинок малый (*Vinca minor L.*) - лекарственное и декоративное растение из семейства кутровых *(Apocynaceae*), из котрого выделено более 20 алкалоидов, используемых фармацевтическими компаниями при производстве препаратов, имеющих гипотензивное действие и избирательно действующих на мозговое кровообращение.

Нами проведена трансформация этих растений различными штаммами *A.rhizogenes (*A4, R-1601, 8196, 15834 - любезно предоставленными Кузовкиной И.Н., ИФР им. К.А.Тимирязева РАН, Россия). Трансформанты идентифицировались по морфологическим, физиологическим и генетическим признакам. Морфологическими и физиологическими маркерами был быстрый и активный рост, пониженное апикальное доминирование, латеральное ветвление и плагиотропность корней. Генетическими маркерами служили гены *rolB* и *virD1.* Детекция *rolB*-гена методом ПЦР подтверждала перенос трансформирующей последовательности Ri-плазмиды, отсутствие *virD1* последовательности указывало на отсутствие не трансформирующих остатков агробактерии.

Дифференциацию побегов из трансформированных корней индуцировали для барвинка малого увеличением концентрации НУК до 1 мг/л и сахарозы до 5 %, побеги наперстянки появлялись спонтанно на среде В5. Морфологическим отличием трансформированных регенерантов от интактных растений были быстро развивающаяся корневая система, значительно большая длина корней, интенсивное побегообразование, небольшая этиоляция листьев для обоих видов растений.

Экстракты полученных растений были проанализированы с помощью ВЭЖХ-МС на наличие индольного алкалоида винкамина для барвинка малого и суммарного состава сердечных гликозидов для наперстянки пурпурной. В качестве стандарта, использовали очищенный фармацевтический винкамин. Пик со временем выхода 0,71 мин соответствовал винкамину, что также было подтверждено масс-спектром. Количество этого алкалоида у растения-регенеранта было больше чем у интактного растения в 1,6 раза. На хроматограммах экстрактов наперстянки также обнаружено увеличение суммарных гликозидов у трансформированных растений.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в результате трансформации двух лекарственных растений в растениях-регенерантах повышается содержание биологически активных соединений по сравнению с интактными растениями и это повышение биосинтеза вторичных метаболитов наблюдается как результат трансформации растения почвенной бактерией *A.rhizogenes*.

Литература:

1.*B.Christensen, R.Müller* // The use of Agrobacterium rhizogenes and its rol-genes for quality improvement in ornamentals - Europ.J.Hort.Sci., 2009, 74, №6, P. 275–287
2.*I.N.Kuzovkina, B.Schneider* // Genetically transformed root cultures – generation, properties and application in plant sciences - Progress in Botany, 2006, 67, №3, P.275-314

INFLUENCE OF GENETIC TRANSFORMATION ON SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FOR TWO SPECIES OF MEDICINAL PLANTS

[1]Lioshina L.G., [1]Bulko O.V., [2]Iegorov O.A.

[1]Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: llioshina@ukr.net
[2]Chemical company "SPOLUKA ", Kiev, Ukraine

The higher plants possess a unique ability to synthesize biologically active compounds that are used in various spheres of life. Along with the traditional methods of breeding methods of genetic transformation of plants are used to increase the synthesis of secondary metabolites.

One of the methods to activate the biosynthesis is the transformation of plants with Ri-plasmid of gram-negative soil bacterium *Agrobacterium rhizogenes* which results in the growth of morphologically similar to roots plant cells (hairy roots). It was shown that Ri-transformation altered the biochemical and morphological parameters for several plants [1,2].

We have presented the work about agrobacterium-mediated transformation of purple foxglove (*Digitalis purpurea L.*) and periwinkle (*Vinca minor L.*) by various strains of *A.rhizogenes*, obtaining of transformed roots culture, plant regeneration and quantitative determination of biologically active substances in these medicinal plant.

Foxglove (*Digitalis purpurea L.*) is a biennial herbaceous plant of *Scrophulariaceae* family, containing about 60 glycosides many of which are used as drugs for enhancing and accelerating the heart beat.

Periwinkle (*Vinca minor L.*) is a medicinal plant and ornamental plant of *Apocynaceae* family. More than 20 alkaloids were extracted from this herb and are used by pharmaceutical companies for manufacturing of drugs that improve cerebral blood flow.

We carried out the transformation of these plants by various strains of *A. rhizogenes* (A4, R-1601, 8196, 15834). The transformants were identified by morphological, physiological and genetic characteristics. Rapid and vigorous growth, reduced apical dominance, lateral branching and plagiotropicy of roots were taken as morphological and physiological markers. Genes *rolB* and *virD1* were taken as genetic markers. Detection of *rolB*-gene using PCR confirmed the transfer of a transforming sequence of Ri-plasmid and the absence of *virD1* sequence indicated the absence of non-transforming Agrobacterium residues.

The differentiation of shoots from the transformed roots for periwinkle was induced by the increase of NAA concentration up to 1 $mg \cdot L^{-1}$ and sucrose concentration up to 5%. The foxglove shoots were formed spontaneously in B5 medium. The fast-growing root system, greater length of roots, intensive shoots formation and small etiolation of leaves for both species were the morphological differences of transformed regenerants from intact plants.

Extracts obtained from regenerated plants were analyzed by HPLC-MS to detect the presence of indole alkaloid vincamine for periwinkle and to determine total amount of cardiac glycosides for purple foxglove. It was observed a significant increase vincamine peak on the chromatograms of periwinkle extracts from the regenerated plants. The concentration of vincamine in those extracts was 160% of its' content in intact plants extracts. The change of chromatographic peaks testified the increase the total glycosides amount in the purple foxglove extracts for transformant plants.

These results indicate that the content of biologically active compounds increased in the regenerated plants comparing to intact plants as a result of the transformation of two herbs. This increase of biosynthesis of secondary metabolites is regarded as a result of plant transformation by the soil bacterium *Agrobacterium rhizogenes.*

References:

1.*B. Christensen, R. Müller.* // The use of Agrobacterium rhizogenes and its rol-genes for quality improvement in ornamentals - Europ.J.Hort.Sci., 2009, 1974, № 6, P. 275-287
2.*I. N. Kuzovkina, B. Schneider.* // Genetically transformed root cultures - generation, properties and application in plant sciences - Progress in Botany, 2006, 1967, № 3, P.275-314

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ШТАММА *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* 28BB-06, АССОЦИИРОВАННОГО С ПРЕСНОВОДНОЙ ГУБКОЙ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Липко И.А., Федорова Г.А., Калюжная О.В., Никулина И.Г., Шишлянникова Т.А., Корнева Е.С., Парфенова В.В.

Учреждение Российской академии наук Лимнологический институт Сибирского отделения РАН, Иркутск, Россия
e-mail: irinalipko@yandex.ru, fgalina@mail.ru

Исследуемый бактериальный штамм *Pseudomonas fluorescens* 28Bb-06 был выделен из губки *Baicalospongia bacilifera*, принадлежащей к эндемичному семейству кремнеголовых *Lubomirskiidae*, обитающих в озере Байкал. Отбор проб губки проводили в июне 2006 г. в прибрежной зоне в районе пос. Большие Коты с глубины 3,6 м. Способность образовывать антибиотические вещества определяли методом одновременного культивирования продуцента и тест-культуры. В качестве тест-микроорганизмов использовали штамм *Pseudomonas aeruginosa*, выделенный из озера Байкал, и коллекционные штаммы *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633*, Enterococcus faecium* 805, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 и *Candida albicans* CBS 8837.

Показано, что штамм 28Bb-06 обладает протеазной (молоко), фосфолипазной (лецитин) и липазной (трибутирин) активностью и подавляет рост условно-патогенных бактерий *E. faecium*, *S. aureus* и *B. subtilis*.

В геноме штамма *P. fluorescens* 28Bb-06 были идентифицированы четыре гена кетосинтазного домена различных поликетидсинтазных кластеров. BLAST-анализ аминокислотных последовательностей выявил невысокий процент гомологии (не более 66%) с известными синтазами биологически активных вторичных метаболитов, что говорит о способности *Pseudomonas fluorescens* продуцировать новые, ранее неохарактеризованные метаболиты.

Культивирование проводили в течение 5 суток при комнатной температуре на трех средах (CP 1, ISP 2, среда Бенетта), микробные экстракты получали экстракцией культуральной жидкости этилацетатом. Активность экстрактов оценивали по водно-метанольным (10% метанола в воде) растворам методом диффузии в агар.

Для выделения соединений с антимикробной активностью из суммарных бактериальных экстрактов использовали метод микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии с одновременной многоволновой фотометрической детекцией (ВЭЖХ-УФ). Исследования выполнены на хроматографе «Милихром А-02» с обращенно-фазным сорбентом C_{18}.

Показано, что спектр антимикробного действия зависит от состава питательной среды и времени культивирования. Одно из соединений выделено в индивидуальном виде и охарактеризовано методами УФ-, ИК- и МС-спектрометрии.

Таким образом, установлено, что штамм *P. fluorescens* 28Bb-06, выделенный из байкальской губки *Baikalospongia bacillifera*, проявляет хорошо выраженные антагонистические свойства по отношению к условно-патогенным микроорганизмам, и может быть использован для выделения и изучения биологической активности и химической природы продуцируемых им метаболитов.

Работа выполнена при поддержке грантом РФФИ – Байкал № 05-05-97271, Лаврентьевского молодежного проекта СО РАН № 6 и междисциплинарного проекта СО РАН № 96.

BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS FROM *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* 28BB-06 ASSOCIATED WITH FRESHWATER SPONGE OF LAKE BAIKAL

Lipko I.A., Fedorova G.A., Kaluzhnaya O.V., Nikulina I.G., Shishlyannikova T.A., Korneva E.S., Parfenova V.V.

Limnological Institute Siberian Branch of Russian Academy of Science, Irkutsk, Russia
e-mail: irinalipko@yandex.ru, fgalina@mail.ru

Bacterial strain Pseudomonas fluorescens 28Bb-06 was isolated from sponge *Baicalospongia bacilifera* belonging to the endemic family *Lubomirskiidae* inhabiting Lake Baikal. Sponge sampling was carried out in shallow part of the lake from depth 3.6 m near s. Bol'shie Kotii in June 2006. Method of simultaneous cultivation of producing bacteria and test microorganisms was applied to determine capability to produce antibiotic substances. Baikalian strain *Pseudomonas aeruginosa* and collection strains *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecium* 805, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Candida albicans* CBS 8837 were used as test microorganisms.

Strain 28Bb-06 possessed protease (milk), phospholipase (lecithin) and lipase (tributirin) activities and inhibited growth of opportunistic bacteria *E. faecium*, *S. aureus* and *B. subtilis*.

Four genes of ketosynthase domain of different poliketidsynthase clusters were identified in genome of *P. fluorescens* 28Bb-06. Low percent homology (no more than 66%) with known synthases of biologically active second metabolites was revealed using BLAST-analyze of amino acid sequences. This fact proved capability of *Pseudomonas fluorescens* to produce novel metabolites not described earlier.

Cultivation was being carried out for 5 days at room temperature using three media (SR1, ISP2, Benetta). Microbial extracts were obtained using extraction of culture broth with ethyl acetate. Extract activities were estimated according water-methanol (10% methanol in water) solutions with method of diffusion into agar.

Method of microcolumn high-performance liquid chromatography with synchronous multiwave UV-detection (HPLC-UV) was applied to separate individual substances with antimicrobial activity from crude bacterial extract. Chromotographic separation of crude extracts was performed with a microbore liquid chromatograph "Millichrom A-02" with reversed-phase sorbent C-18.

It was shown that spectrum of antimicrobial action depended on media composition and cultivation period. One individual substance was extracted and characterized with methods of UV-, IR- and MS-spectrometry.

Thus it was determined that strain *P. fluorescens* 28Bb-06 isolated from baikalian sponge *Baikalospongia bacillifera* had well-marked antagonistic properties against opportunistic microorganisms and could be used to extract and study biological activity and chemical structure of produced metabolites.

The work was supported by grant of RFBR-Baikal № 05-05-97271, Lavrentiev youth project SB RAS №6 and by Interdisciplinary project SB RAS № 96.

ВМІСТ МЕРОТЕРПЕНОВОГО АНТИБІОТИКА БАКУЧІОЛУ В АСЕПТИЧНИХ ПАГОНАХ ТРЬОХ ВИДІВ РОДУ *SPIRAEA*

[1]Листван К.В., [2]Остапчук А.М.

[1]Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, Україна
e-mail: lystvan@ukr.net
[2]Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, Київ, Україна

Бакучіол – рослинний антибіотик меротерпенової природи, що має високу активність проти широкого спектру грампозитивних бактерій і грибів-дерматофітів. Крім того, бакучіол виявляє противірусні та протипухлинні властивості, протизапальну та антиоксидантну активності тощо, в зв'язку з чим вважається перспективною речовиною для створення нових ліків та косметичних засобів. В зв'язку з цим є актуальним і досить активно вивчається питання можливих джерел отримання бакучіолу (як хімічний синтез, так і отримання з рослинної сировини, вирощеної *in planta* або *in vitro*).

Донедавна здатність до біосинтезу цього фенолу була відома лише для деяких видів триби *Psoraleeae* (*Fabaceae*), зокрема, для *Psoralea corylifolia* [1] та *P.drupacea* [2]. Лише в останні роки бакучіол виявлено і в представниках інших родин, зокрема в етанольних екстрактах стебел ендемічного тайванського виду спіреї *Spiraea formosana* (*Rosaceae*) [3]. В даній роботі ми мали на меті дослідити вміст бакучіолу у пагонах трьох інших видів роду *Spiraea – S.dasyantha, S. betulifolia spp. lucida* і *S. x vanhouttei* та з'ясувати можливість застосування асептичних рослин даних видів як джерела антибіотику.

Рослини *Spiraea*, що культивуються в умовах *in vitro*, отримано з Колекції зародкової плазми Інституту клітинної біології і генетичної інженерії НАНУ. Зібрану біомасу надземної частини рослин було висушено при кімнатній температурі і проекстраговано хлороформом. Сухі екстракти розчинено в ацетонітрилі і досліджено на наявність бакучіолу в них методом ВЕРХ.

Досліджувану речовину знайдено в екстрактах усіх трьох видів *Spiraea*. Тобто, вказані види дійсно здатні до біосинтезу бакучіолу, що узгоджується з даними Wu et al. [3]. Проте кількість його в екстрактах дуже незначна (сліди), що не дає можливості розглядати культивовані *in vitro* пагони *S. betulifolia spp. lucida*, S*. x vanhouttei* та *S.dasyantha* в якості потенційного джерела антибіотика бакучіолу.

Література:

1. *Mehta G, Nayak UR, Dev S* (1973) Meroterpenoids. 1. Psoralea corylifolia Linn. 1. Bakuchiol, a novel monoterpene phenol. Tetrahedron 29:1119-25
2. *Бондаренко А.С., Айзенман Б.Е., Бакина Л.А., Кожина И.С., Приходько В.А., Мишенкова Е.Л., Мещеряков А.А.* Изучение антимикробной и антивирусной активности эфирного масла из Psoralea drupacea Bunge и его компонентов // Растительные ресурсы. – 1974. – том X. – с.583-588
3. *Wu T, Hwang C, Kuo P, Damu A, Chou C, Chen C* (2002) New diterpenoid alkaloid from Spiraea formosana. Heterocycles 57: 1495-1500

CONTENT OF ANTIBIOTIC BAKUCHIOL IN ASEPTIC SHOOTS OF THREE *SPIRAEA* SPECIES

[1]Lystvan K., [2]Ostapchuk A.

[1]Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: lystvan@ukr.net
[2]Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

Bakuchiol is a plant-derived meroterpene with strong antimicrobial activity. It has been found to inhibit the growth of a wide range of Gram-positive micro-organisms and dermatophytic fungi. In addition bakuchiol also displays anti-viral, anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-tumour etc. activity, that suggest it may be incorporated into new medicines and cosmetics. Thereby possible sources of bakuchiol are investigating (both a chemical synthesis and a production from plants cultivated *in planta* or *in vitro*).

Until recently the ability to synthesize bakuchiol has been known only for some species from the tribe *Psoraleeae* including *Psoralea corylifolia* [1] and *P.drupacea* [2]. In the last years bakuchiol has been found as well in some species of non-*Fabaceae* families including the ethanolic extracts of stem of *Spiraea formosana* (*Rosaceae*), an endemic species of Taiwan [3]. Investigation of bakuchiol content in shoots of three other *Spiraea* species – *S.dasyantha, S. betulifolia spp. lucida* and *S. x vanhouttei*, as well as the possibility of using aseptic *Spiraea* plants for the antibiotic production was the main goal of the present work.

In vitro cultivated *Spiraea* plants were obtained from Germplasm bank of world flora of Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NASU. Biomass of aerial parts of the plants was dried and extracted by chloroform. The dry extracts were dissolved in acetonitrile and bakuchiol content was identified by HPLC analyses

The antimicrobial was detected in the extracts of all investigated *Spiraea* species. These species thus are able to synthesize bakuchiol that agrees with data of Wu et al. [3]. However, the quantities of the antimicrobial were very small (traces only) that suggest the aseptic shoots of *S. betulifolia spp. lucida, S. x vanhouttei* and *S.dasyantha* are unsuitable as a source of bakuchiol.

References:

1. *Mehta G, Nayak UR, Dev S* (1973) Meroterpenoids. 1. Psoralea corylifolia Linn. 1. Bakuchiol, a novel monoterpene phenol. Tetrahedron 29:1119-25
2. *Bondarenko AS, Aizenman BE, Bakina LA, Kozhina IS, Prykhodko VA, Mishenkova EL, Meshcheryakov AA* (1974) Antimicrobial and antiviral activity of essential oil from Psoralea drupacea and its activity Rastit Res 10(4): 583-8
3. *Wu T, Hwang C, Kuo P, Damu A, Chou C, Chen C* (2002) New diterpenoid alkaloid from Spiraea formosana. Heterocycles 57: 1495-1500

ДИНАМИКА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПИГМЕНТОВ У МИКРОВОДОРОСЛИ *SCENEDESMUS*

Макарова Е.И., Отурина И.П., Сидякин А.И.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
e-mail: irina.oturina@mail.ru

Микроводоросли являются базовым звеном гидросистем благодаря способности поглощать солнечную энергию при участии фотосинтетически активных пигментов, качественное и количественное соотношение которых является строго индивидуальным признаком. Накопление пигментов у представителей зеленых микроводорослей во многом определяет уровень их биологической продуктивности. Между содержанием альгомассы и концентрацией основных фотосинтетических пигментов существует определенная корреляционная связь, характер которой зависит от фазы роста культуры и условий культивирования.

Данные по изучению зависимости между накоплением биомассы и содержанием пигментов у микроводорослей в научной литературе практически отсутствуют. Целью настоящего исследования явился анализ динамики накопления альгомассы и основных пигментов фотосинтеза (хлорофиллов и каротиноидов) в клетках зеленой микроводоросли *Scenedesmus* sp.

Периодическое культивирование сценедесмуса проводили на минеральной среде Тамия в стандартной установке. Содержание пигментов в клетках определяли спектрофотометрически.

Основными фотосинтетически активными пигментами у зеленых водорослей являются хлорофиллы *a* и *b* из группы тетрапирролов и каротиноиды – производные изопрена. Максимальное содержание хлорофиллов *a и b в* клетках *Scenedesmus* sp. отмечено в экспоненциальную фазу роста культуры (23,9 и 10, 26 мг/л соответственно), для которой была характерна максимальная интенсивность фотосинтеза. В конце линейной фазы роста содержание хлорофиллов начинало снижаться. К началу фазы отмирания клеток микроводоросли содержание хлорофиллов *a и b* достигало минимального значения (9,59 и 2,36 мг/г соответственно). Накопление каротиноидов у сценедесмуса до 19,99 мг/г происходило пропорционально увеличению биомассы до конца линейной фаза роста.

Высушивание клеток сценедесмуса неизбежно приводило к потере существенного количества фотосинтетических пигментов, что явилось причиной нарушения прямой корреляционной зависимости между накоплением альгомассы и содержанием пигментов.

Таким образом, закономерности, установленные в ходе периодического культивирования микроводорослей в лабораторных условиях, позволяют расшифровать механизмы адаптации физиологических функций обитателей альгофлоры пресных водоемов к условиям их существования.

DYNAMICS OF PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY PIGMENTS IN MICROALGAE *SCENEDESMUS*

Makarova E.I., Oturina I.P., Sidyakin A.I.

Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Ukraine.
e-mail: irina.oturina@mail.ru

Microalgae are a basic part of hydraulic systems for its ability to absorb solar energy, with the participation of photosynthetic active pigments, qualitative and quantitative ratio of which is an individual trait. The accumulation of pigments in representatives of green algae largely determines the level of their biological productivity. There is a definite correlation between the content algomass and concentration major photosynthetic pigments, the nature of which depends on the growth phase of culture and cultivation conditions.

Data on the character of the relationship between the accumulation of biomass and pigment content of algae in the scientific literature are virtually absent. The purpose of this study was to analyze dynamic of accumulation algomassy and major photosynthetic pigments (chlorophylls and carotenoids) in the cells of green algae *Scenedesmus* sp.

Periodic cultivation *Scenedesmus* performed on a mineral medium Tamiya in the standard setting. Pigment content in cells was determined spectrophotometrically.

The main photosynthetic active pigments in green algae are chlorophyll *a* and *b* of a tetrapyrroles group and carotenoids – isoprene derivatives. The maximum content of chlorophyll *a* and *b* in the cells of *Scenedesmus* sp. noted in the exponential growth phase of culture (23,9 and 10,26 mg/l, respectively), for which was characterized by a maximum rate of photosynthesis. At the end of the linear growth phase of chlorophyll content started to decline. By early phase of cell death microalgae content of chlorophylls *a* and *b* reaches the minimum value (9,59 and 2.36 mg/l, respectively). Accumulation of carotenoids in *Scenedesmus* to 19,99 mg/l occurred in proportion to the biomass until the end of the linear growth phase.

Drying cells *Scenedesmus* sp. inevitably led to the loss of significant amounts of photosynthetic pigments, which caused the violation of the direct correlation between the accumulation of algomass and content of pigments.

Thus, the laws established during periodic cultivation of microalgae in the laboratory, give insight into the mechanisms of adaptation of the physiological functions of the inhabitants of freshwater algal flora to the conditions of their existence.

РЕГУЛЯЦИЯ НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПОВ БИОСИНТЕЗА ТЕРПЕНОИДНЫХ ИНДОЛЬНЫХ АЛКАЛОИДОВ И НАКОПЛЕНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ВИНКАМИНА В КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ *VINCA MINOR* L.

Молчан О.В., Ромашко С.Н., Юрин В.М.

Белорусский Государственный Университет, Минск, Беларусь
e-mail: olga_molchan@mail.ru

Фармакологическая ценность барвинка малого (*Vinca minor* L.), относящегося к семейству *Apocynaceae,* обусловлена высоким содержанием в надземной части растения алкалоидов индольного ряда, основным из которых является дитерпеновый алкалоид винкамин. Содержание винкамина составляет 25-65% суммы алкалоидов барвинка. Лекарственные препараты, содержащие сумму алкалоидов барвинка малого (напр. винкатон («Гедеон Рихтер», Венгрия)) применяют при спазмах сосудов головного мозга, для лечения полиневритов и др. заболеваний [1].

Процессы биосинтеза терпеноидных индольных алкалоидов (ТИА) в клетках *Vinca minor* L. в настоящее время остаются практически не изученными. Ключевым ферментом биосинтеза индольных алкалоидов является L-триптофан декарбоксилаза (ТДК, EC 4.1.1.28) [2]. Впервые ген, кодирующий ТДК, был выделен из *Catharanthus roseus*, затем было показано, что в растениях *Camptotheca acuminata* функционируют белки, аминокислотные последовательности которых характеризуются 67 и 71% гомологией с ТДК катарантуса розового. К настоящему времени в литературе отсутствуют данные по исследованию участия ТДК в биосинтезе алкалоидов барвинка малого. Не изученными остаются накопление ТИА, а также активность ТДК, и эндогенное содержание триптамина, как в нативных растениях, так и в культурах *in vitro Vinca minor* L. В то же время культуры клеток и тканей растений *in vitro* позволяют не только получать экологически чистые фармакологически активные препараты растительного происхождения, но и служат моделью при изучении механизмов биосинтеза вторичных метаболитов. Однако на данный момент, существуют лишь единичные публикации, касающиеся введения в культуру *in vitro Vinca minor* L. [3]. Поэтому в настоящей работе была предпринята попытка исследовать взаимосвязь регуляции начальных этапов биосинтеза ТИА (активности ТДК и содержания эндогенного триптамина) и накопления предшественников винкамина в каллусной культуре *Vinca minor* L

Каллусная культура была получена из листовых эксплантов, культивируемых в темноте при температуре 25^0С на агаризованной питательной среде Мурасиге и Скуга, содержащей различные концентрации кинетина и нафтилуксусной кислоты (НУК). Полученный каллус субкультивировали в темноте или на свету (2500–3000 люкс) с 16-часовым фотопериодом при 25^0 С. Пересадку осуществляли каждые 35-40 суток на МС-среде, содержащей 1 мг/л кинетина и НУК в различных концентрациях. Для определения активности ТДК по методу Sangwan с соавт. (1998) использовали 2-х летнюю каллусную ткань. Определение содержания винкамина и его предшественников осуществляли с помощью жидкостного хроматографа высокого давления Agilent 1100, США.

В данной работе впервые был проведен анализ кинетических характеристик ТДК каллусной ткани *Vinca minor*. Активность фермента, определяемая при оптимальных условиях, составляла 0,5-0,7 нмоль триптамина /(мг белка мин). ТДК каллусной ткани *Vinca minor* является пиридоксаль-зависимым ферментом с максимальной активностью при pH 6,5-7,5 и температуре 35^0С. Значение Км = 0.25 ± 0.03 mM.

Также было установлено, что активность ТДК и содержание эндогенного триптамина в каллусной ткани повышаются при культивировании на свету. Показано изменение активности ТДК также в течение ростового цикла. Так, установлено, что и активность ТДК, и эндогенный уровень триптамина являются максимальными на 30-е сутки культивирования к завершению лог-фазы ростового цикла, а затем снижаются в течение стационарной фазы. Характер влияния НУК и на активность ТДК, и на эндогенный уровень триптамина зависит от концентрации фитогормона. При низких концентрациях НУК наблюдается повышение активности ТДК и в темноте и на свету, а при высоких – понижение. В то время как эндогенный уровень триптамина в каллусных тканях, культивируемых на средах с различным содержанием НУК варьирует не значительно.

Было установлено, что уменьшение в среде культивирования концентрации НУК, либо замена НУК на 2,4-Д, приводит к значительному снижению содержания триптамина и секологанина и др. предшественников винкамина и ингибирует дальнейший процесс биосинтеза индольных алкалоидов.

Обнаруженные эффекты позволяют предположить, что в исследованных каллусных линиях *Vinca minor* уровень биосинтеза ТИА связан с процессами дифференциации и уровнем активности ТДК.

Литература:

1. *Tulyaganov T.S. and Nigmatullaev A.M.* Alkaloids of Vinca minor. Chemistry of Natural Compounds. 2000. V. 36. № 5. P. 540.
2. *Facchini P.J., Huber-Allanach K.L., Tari L.W.* Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. Phytochemistry. 2000. V. 54. P.121-138.
3. *Tanaka N., Takao M., Matsumoto T.* Vincamine production in multiple shoot culture derived from hairy roots of *Vinca minor.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1995. V. 41. P. 61-64.

REGULATION OF TERPENOID INDOLE ALKALOIDS BIOSYNTHESIS INITIAL STEPS AND VINCAMINE PRECURSOR ACCUMULATION IN CALLUS CULTURE OF *VINCA MINOR L.*

Molchan O.V., Romashko S.N., Yurin V.M.

Belarussian State University, Minsk, Belarus
e-mail: olga_molchan@mail.ru

Vinca minor L., a member of *Apocynaceae*, is an important medicinal plant producing of terpenoid indole alkaloids (TIA). A sum of *V. minor* alkaloids have been used in clinical practice including in numerous drugs (for example - vincatone, “Gedeon Richter”, Hungary). The major alkaloid of *V. minor* leaves is the monoterpenoid indole alkaloid vincamine (0,13 %). The vincamine content is 25-65% from total alkaloids. Vincamine and its derivatives reduce blood pressure and have been used as a cerebral vasodilators. [1]

To date, TIA biosynthesis in *V. minor* plants remains very poorly investigated. The key enzyme involved in the early stages of indole alkaloid biosynthesis is the L-tryptophan decarboxylase (aromatic L-amino acids decarboxylase, EC 4.1.1.28) [2]. Biochemical and molecular properties as well as regulation of TDC are the best characterized in various *C. roseus* tissues. TDC activity and it’s mRNA level were also detected in several species of *Camptotheca* family. Until now there has been no report on TIA biosynthesis and TDC participation in alkaloids synthesis in lesser periwinkle. There is also no information about level of TDC activity and content of endogenous tryptamine both in plants and cultured *V. minor* cells. Nothing is known also about the enzyme regulation and interaction of TDC activity with tryptamine accumulation and growth parameters in *V. minor*. Meanwhile, *in vitro* cell and tissue cultures which, as compared to native plant, are characterized with shortened growth cycle and, correspondingly, accelerated metabolic reactions, represent a convenient model to study TIA biosynthesis and its regulation in plant cells. However a limited number of studies have been carried out on *in vitro* culture of *V. minor* [3]. The following experiments were carried out to investigate the regulation of TIA biosynthesis initial steps (tryptophan decarboxylase activity and endogenous tryptamine content) as well as vincamine precursor accumulation in *Vinca minor* L callus tissue in relation to growth intensity and cultivation conditions.

Callus culture was initiated from leaf explants of *Vinca minor* plants on MS medium supplemented with various concentrations of 6-furfurylaminopurine (kinetin) and a-naphthaleneacetic acid (NAA). Calli were subcultivated every 35 – 40 days on MS medium, supplemented with 1mg * l^{-1} kinetine and different concentrations of NAA. Callus cultures were incubated in the dark or under illumination with light intensity of 2500–3000 Lux and light period of 16 h /day at 25^0 C. Biochemical analysis was carried out on 2-years callus cultures. TDC activity and tryptamine accumulation were assayed as described by Sangwan et al. (1998). Alkaloids and their precursors were determined from the crude plant extract by high performance liquid chromatography (HPLC: Agilent 1100, USA).

Our research team demonstrates for the first time the TDC activity in *V. minor* callus. In the present work the general properties of TDC from *V. minor* callus cells were described. Optimum pH for this enzyme was found to be 6.5-7.5. Enzyme activity was dependent on exogenously supplied pyridoxal-5’-phosphate. The apparent Km value of TDC for L-tryptophan was 0.25 ± 0.03 mM.

TDC was strongly activated by the light and largely unaffected by NAA. The activities of TDC and tryptamine level are under strict developmental control. TDC activity was highly regulated achieving a maximum by day of 35 of callus development. Our results suggest that light stimulates TDC activity and tryptamine accumulation in calli. The growth rate of callus did not require light for induction whereas TDC activity and tryptamine content were increased approximately 1.5-2 fold after light treatment of dark-grown callus.

It was also demonstrated the decreasing of NAA content or the replacement of NAA to 2,4-D in the incubation medium resulted in the significant reduction of tryptamine and secologanine accumulation. The vincamine were not detected in all lines of callus culture. However unknown compound was identified in the callus cultivated on MS medium supplemented with 5,37 μM NAA and 4,65 μM kinetin. Its UV spectra was similar to vincamine UV spectra but had different retention times.

Some possible relationships between tryptamine, TIA biosynthesis and differentiation processes are discussed.

References:

1. *Tulyaganov T.S. and Nigmatullaev A.M.* Alkaloids of Vinca minor. Chemistry of Natural Compounds. 2000. V. 36. № 5. P. 540.
2. *Facchini P.J., Huber-Allanach K.L., Tari L.W.* Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. Phytochemistry. 2000. V. 54. P.121-138.
3. *Tanaka N., Takao M., Matsumoto T.* Vincamine production in multiple shoot culture derived from hairy roots of *Vinca minor.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1995. V. 41. P. 61-64.

ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ И МЕТОДОМ ХИМИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ

[1]Мурадов П.З., [2]Велиев М.Г., [1]Алиева С.Р., [2]Шатирова М.И., [1]Ягубова Г.Г.

[1] Институт Микробиологии НАНА, Баку, Азербайджан
e-mail: mpanah@mail.ru
[2] Институт полимерных материалов НАНА, Сумгаит, Азербайджан

Изучение природных биологически активных соединений, синтезированных микроорганизмами, грибами, растениями представляет особый теоритический и практический интерес, в связи с их лечебными свойствами и сложной реакционноспособной химической структурой [1, 2]. Подобными веществами являются высоконепредельные полифункциональные соединения, такие как полиацетилены и полисахариды. Как известно эти соединения обладают широким диапозоном действия и даже в ничтожно малых количествах подавляют рост патогенной микробиоты.

Продолжая систематические исследования в этом направлении, биосинтетическим и химическим методами нами были получены полиацетиленовые соединения и полисахариды. В работе были использованы широко распространенные в различных экологических зонах Азербайджана базидиальные грибы видов: *Ganoderma lucidum, Pleurotus ostreatus, Laetiporus sulpherus, Trametes hirsute*. Грибы выращивались методом глубинного культивирования в течении 10 дней при температуре 28°С в среде, состоящей из пшеничных отрубей. Образовавшуюся биомассу грибов измельчали и экстрагировали этиловым эфиром уксусной кислоты. Полученные осадок и эфирные экстракты анализировали методами тонкослойной и обращеннофазовой-жидкостной хроматографией. Проведенные химические исследования показали, что водный остаток в основном состоял из полисахаридов (70-80%), а эфирный экстракт содержал больше полиацетиленовых соединений (65-70%). Полученные результаты показали, что экстрагированные полиацетиленовые кислоты имели в своем составе от 8 до 10 атомов углерода, от 1 до 3 двойных и от 2 до 3 тройных связей и представлены на рисунке одной общей формулой (I - IV):

$$R-C\equiv C-C\equiv C-CH=CH-CH_2COOH \quad \text{(I- IV)}$$

где R= CH_3- (I) $HC\equiv C-$ (II) $HC\equiv CCH_2-$ (III) $CH_2=C=CH-$ (IV)

Полиацетиленовые карбоновые кислоты (I - IV) были синтезированы также химическим методом – окислением первичных полиацетиленовых спиртов в присутствии смеси, состоящей из хромового ангидрида и серной кислоты. Для детального изучения и подтверждения химической структуры каждого из полученных обоими путями соединений осуществлялась ИК и ЯМР спектроскопия.

Все полученные соединения содержат высоконепредельные фрагменты с двойными и тройными связями и являсь весьма реакционноспособными, могут быть использованы в тонком органическом синтезе. Полученные результаты подтверждают наличие биологически активных соединений в исследованных базидиальных грибах, открывая возможность их применения для получения биологических препаратов, с их дальнейшим использованием в медицине.

Литература:

1. *М.А.Салманов, М.Г.Велиев, П.З.Мурадов* // Базидиомицеты-перспективные продуценты полиацетиленовых соединений – Известия НАНА, серия биологических наук, 2004, №3-4, с.159-166
2. *Н.В. Белова* // Базидиомицеты – источники биологически активных веществ–Растительные ресурсы, 1991, т.27, №2, с.8-17

OBTAINING OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS BY USAGE OF BASIDIAL FUNGI AND METHOD OF CHEMICAL OXIDATION

[1]Muradov P.Z., [2]Veliyev M.G., [1]Aliyeva S.R., [2]Shatirova M.I., [1]Yagubova G.G.

[1] Microbiology Institute of ANAS. Baku, Azerbaijan
e-mail: mpanah@mail.ru
[2]Institute of Polymer Materials, Sumgayit, Azerbaijan

Studying of the natural biologically active compounds synthesized by microorganisms, fungi, and plants represents special theoretical and practical interest, because of their medical properties and difficult reactive chemical structure [1, 2]. Similar substances are high unsaturated multifunctional compounds, such as polyacetylenes and polysaccharides. As it's known these compounds possess wide rage actions and even in is insignificant small quantities suppress growth pathogenic microbiota.

Continuing researches in this direction were received polyacetylene compounds and polysaccharides by biosynthetic and chemical methods. Basidial fungi of *Ganoderma lucidum, Pleurotus ostreatus, Laetiporus sulpherus, Trametes hirsute* species widespread in the different Ecological zones of Azerbaijan were used in the work. Fungi were grown by method of deep cultivation within 10 days under the temperature 28°C in the medium composed of wheat bran. The formed biomass was being crumbled up and extracted with ethyl ether of acetic acid. Obtained residue and radio ethers' extracts separately analyzed by methods of thin-layer and liquid chromatography. It was established that structure of the water residue, basically, consists from the polysaccharides up to 70-80%, but the ether extract contains polyacethylene compounds up to 65-70 %. Therefore, it is revealed, that obtained polyacethylene acids have in their contents: from 8 up to 10 atoms of carbon, and from 1 up to 3 double bonds and 2-3 triple bonds and presented by one general formula (I - IV):

$$R-C\equiv C-C\equiv C-CH=CH-CH_2COOH \quad \text{(I- IV)}$$

where R= CH_3- (I) $HC\equiv C-$ (II) $HC\equiv CCH_2-$ (III) $CH_2=C=CH-$ (IV)

Polyacethylene carbonic acids (I - IV) were also synthesized by a chemical method – oxidation of primary polyacetylene alcohols in presence of a mix consisting of chromic anhydride and sulfuric acid. For detailed studying and confirmation of chemical structure of each compound (I - IV) from both ways, the IR and PMR spectroscopy were conducted.

All received compounds contain high unsaturated fragments with double and triple bonds. Being rather reactive they can be used in thin organic synthesis. Received results confirm presence of biologically active compounds in investigated Basidial fungi. This opens the possibility of their application for obtaining of biological preparations, with their further use in medicine.

Reference:

1.*M.A. Salmanov, M.G. Veliev, P.Z. Muradov* // Basidiomycetes - the perspective producents of polyacethylene compounds // Proceedings of Azerbaijan NAS, Biological sciences, 2004, №3-4, pp.159-166
2.*Belova N.V.* Basidiomycetes - the source of biological active substances // Plant resources, 1991 , v.27, №2, pp.8-17

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ β-СИТОСТЕРОЛА АЛКАНОТРОФНЫМИ РОДОКОККАМИ В ПРИСУТСТВИИ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

[1]Ноговицина Е.М., [2]Гришко В.В., [1]Ившина И.Б.

[1]Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия
e-mail: info@iegm.ru
[2]Институт технической химии УрО РАН, Пермь, Россия

Микробиологическая трансформация природных стеролов позволяет эффективно получать физиологически активные соединения, обладающие выраженным противовоспалительным, иммуносупрессивным, гестагенным, диуретическим и др. действием. Доступность молекул стеролов для микробных клеток, ограниченная низкой растворимостью данных субстратов в водной среде, значительно повышается в присутствии поверхностно-активных веществ. В основном в качестве солюбилизирующих агентов в процессе биотрансформации стеролов применяются синтетические сурфактанты Твины и циклодекстрины – циклические олигосахариды, образующие комплексы с гидрофобными соединениями [1]. Ранее нами было показано [2, 3], что актинобактерии рода *Rhodococcus* проявляют выраженную холестеролоксидазную активность в отношении β-ситостерола – растительного стерола, получаемого из отходов дервообрабатывающей промышленности. При этом в качестве основного продукта образуется стигмаст-4-ен-3-он, перспективный в качестве лекарственного препарата для лечения эндокринных заболеваний [4]. Направленная биоконверсия β-ситостерола в стигмаст-4-ен-3-он родококками достигается при добавлении в среду культивирования бактериальных клеток 0,5 г/л исходного субстрата, а также 2,5 г/л *н*-гексадекана и 0,2 г/л пальмитиновой кислоты в качестве дополнительных активаторов холестеролоксидазной реакции. С целью поиска условий биоконверсии β-ситостерола в стигмаст-4-ен-3-он при использовании высоких концентраций стерола исследовано влияние поверхностно-активных соединений на стеролтрансформирующую активность клеток родококков.

В работе использован штамм *R. erythropolis* ИЭГМ 487 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов [5]. Установлено, что в условиях добавления β-ситостерола в среду ферментации в виде раствора в изопропаноле в концентрациях свыше 0,5 г/л степень образования целевого продукта не превышает 26,4%. Более эффективная биотрансформация исходного субстрата достигается при использовании синтетических сурфактантов в качестве эмульгаторов стерола. Наилучшие результаты регистрируются в присутствии Твина-80, при этом уровень конверсии β-ситостерола в стигмаст-4-ен-3-он составляет 37,6-49,5% в зависимости от исходной (1,0-2,0 г/л) концентрации стерола. В результате исследования влияния β-циклодекстрина на процесс биотрансформации β-ситостерола установлено, что степень образования целевого продукта напрямую зависит от способа внесения стерола с β-циклодекстрином в среду ферментации. Так, добавление стерола в виде смеси с β-циклодекстрином (1 : 2) или комплекса включения с β-циклодекстрином в изопропаноле приводит к понижению уровня стеролтрансформирующей активности *R. erythropolis* ИЭГМ 487 на 10-30 % по сравнению с результатами, полученными при биоконверсии β-ситостерола в присутствии Твина-80. Максимальная (77,3-93,4 %) эффективность процесса образования стигмаст-4-ен-3-она достигается при условии добавления в ростовую среду 2,0-6,0 г/л β-ситостерола в виде смеси с β-циклодекстрином (1:1) в 1,2%-м водном растворе Твина-80. Повышение исходной концентрации субстрата до 8,0-10,0 г/л приводит снижению стеролтрансформирующей активности родококков на 20-40 %.

Таким образом, в результате проведенных исследований определены оптимальные условия процесса биоконверсии β-ситостерола в стигмаст-4-ен-3-он родококками при добавлении стерола в высоких концентрациях.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (проект № 10-04-96032-р_урал_а), программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие» и Междисциплинарного проекта фундаментальных исследований (№ 09-М-134-2001).

Литература:

1. *A. Malaviya, J. Gomes*. // Androstenedione production by biotransformation of phytosterols – Bioresour. Technol., 2008, v. 99, p. 6725-6737
2. *В.В. Гришко, Е.М. Ноговицина, И.Б. Ившина.* // Биокаталитическое получение физиологически активных соединений на основе растительного β-ситостерола – Катализ в промышленности, 2009, N1, с. 67-74
3. *Е.М. Ноговицина, Е.В. Тарасова, В.В. Гришко, И.Б. Ившина.* // Оптимизация процесса биокаталитического получения стигмаст-4-ен-3-она из β-ситостерола – Матер. VII Междунар. Конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии», г. Минск, 2010, с. 295-297
4. *S. Streber.* // Use stigmast-4-en-3-on in the treatment of androgen dependent disease – Patent USA, 1993, N5264428
5. Каталог штаммов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов / Ред. И.Б. Ившиной – М.: Наука, 1994,163 с.

β-SITOSTEROL BIOTRANSFORMATION BY ALKANOTROPHIC RHODOCOCCI IN THE PRESENCE OF SURFACE-ACTIVE COMPOUNDS

[1]Nogovitsina Ye.M., [2]Grishko V.V., [1]Ivshina I.B.

[1]Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia. e-mail: info@iegm.ru
[2]Institute of Technical Chemistry, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

Microbial transformation of natural sterols allows effective production of physiologically active compounds possessing marked anti-inflammatory, immunosuppressive, progestive, diuretic and other activities. Availability of sterol molecules to microbial cells is restricted by low solubility of these substrates in an aqueous medium, and is significantly increased in the presence of surface-active substances. Basically, in the process of sterol biotransformation, synthetic surfactants, e.g. Tween 80, and cyclic oligosaccharides, cyclodextrins, that form complexes with hydrophobic compounds are used as solubilizing agents [1]. We have previously shown [2, 3] that *Rhodococcus* actinobacteria revealed high cholesterol oxidase activity toward β-sitosterol, a plant sterol derived from of pulp-and-paper industry wastes. The main transformation product formed is stigmast-4-ene-3-one, a perspective compound in treating endocrine diseases [4]. To achieve directed bioconversion of β-sitosterol to stigmast-4-ene-3-one by rhodococci, 0.5 g/l starting substrate, as well as 2.5 g/l *n*-hexadecane, and 0.2 g/l palmitic acid as additional activators of cholesterol oxidase reaction were added to the culture medium. In search for optimal conditions for bioconversion of β-sitosterol to stigmast-4-ene-3-one using high concentrations of sterol, we studied the effects of surface-active compounds on the sterol transforming activity of *Rhodococcus* cells.

We used *R. erythropolis* IEGM 487 from the Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms, IEGM [5]. It was found that the level of final product obtained did not exceed 26.4% when β-sitosterol solution in isopropyl alcohol at concentrations above 0.5 g/l was added to the fermentation medium. The initial substrate was biotransformed more efficiently when synthetic surfactants were used as sterol emulsifiers. The best results were obtained in the presence of Tween-80, and the conversion rate of β-sitosterol to stigmast-4-ene-3-one was 37.6-49.5% depending on the initial (1.0-2.0 g/l) concentration of sterol. The study of β-cyclodextrin effect on the process of β-sitosterol biotransformation revealed that the level of the final product depended directly on the method of sterol and β-cyclodextrin addition to the fermentation medium. Thus, addition of a sterol/β-cyclodextrin mixture (1:2) in isopropanol or β-cyclodextrin inclusion complex (1:1) in isopropanol lead to the decreased level of sterol-transforming activity of *R. erythropolis* IEGM 487 by 10-30% compared to β-sitosterol bioconversion in the presence of Tween-80. The maximum efficiency (77.3-93.4%) of stigmast-4-ene-3-one production was achieved when 2.0-6.0 g/l β-sitosterol in combination with β-cyclodextrin (1:1) in the aqueous solution of Tween-80 (1.2%) was added to the growth medium. Increase in the initial substrate concentration up to 8.0-10.0 g/l resulted in the reduction of sterol-transforming activity of rhodococci by 20-40%.

Thus, this study determined the optimum conditions for β-sitosterol bioconversion to stigmast-4-ene-3-one by rhodococcal cells at high sterol concentrations.

The research was supported by RFBR grants (project № 10-04-96032-r_ural_a), Program for Basic Research of RAS and the Interdisciplinary Project for Basic Research (№ 09-M-134-2001).

References:

1. *A. Malaviya, J. Gomes.* // Androstenedione production by biotransformation of phytosterols – Bioresour. Technol., 2008, v. 99, p. 6725-6737
2. *V.V. Grishko, Ye.M. Nogovitsina, I.B. Ivshina.* // The biocatalytic obtainment of physiologically active compounds based on vegetative β-sitosterol – Catalysis in Industry, 2009, v. 1, N2, p. 157-164
3. *Ye.M. Nogovitsina, Ye.V. Tarasova, V.V. Grishko, I.B. Ivshina.* // Optimization of the biocatalytic process of stigmast-4-ene-3-one production from the β-sitosterol – Mater. VII Intern. Conf. «Current state and prospects of development of microbiology and biotechnology», Minsk, 2010, p. 295-297
4. *S. Streber.* // Use of stigmast-4-en-3-one in the treatment of androgen dependent disease – Patent USA, 1993, N5264428
5. Catalogue of strains of the Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms. / Ed. I.B. Ivshina - Moscow: Nauka, 1994.163 p.

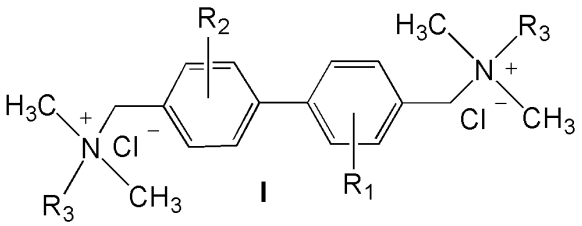
ФУНГИЦИДНАЯ КОМПОЗИЦИЯ СИНЕРГЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ БИФЕНИЛСОДЕРЖАЩИХ ЧЕТВЕРТИНЫХ АММОНИЕВЫХ СОЛЕЙ

[1]Ольховик В.К., [2]Желдакова Р.А., [1]Калечиц Г.В., [3]Зубенко Ю.С., [3]Поткин В.И.

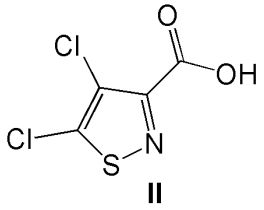
[1]Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси
e-mail: slavol@ichnm.basnet.by
[2] Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
[3] ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

В настоящее время проблема борьбы с микроорганизмами, вызывающими инфекционные заболевания у *человека* и животных, биодеструкцию материалов, биообрастание оборудования является актуальной, несмотря на достаточно большой выбор биоцидных препаратов. Перспективным способом борьбы с грибковыми поражениями различных материалов и биологических объектов является переход на применение композиций, например, четвертичных аммониевых солей (ЧАС) с синергистами [1] .

Ранее нами было показано, что четвертичные аммониевые соединения 2,4,4'-замещенных бифенилов **(I)** проявляют высокую антимикробную и фунгицидную активность [2]. Другой известной группой производных бифенила, проявляющей высокую фунгицидную активность, являются амиды гетероциклических карбоновых кислот и 2-аминобифенилов [3]. С целью усиления фунгицидных эффектов у четвертичных аммониевых солей 2,4,4′-замещенных бифенилов нами были изучены композиции наиболее активных ЧАС с 4,5-дихлоризотиазол-3-карбоновой кислотой (ИТК) **(II)** [4].



I



II

Тест-объектами служили следующие штаммы фитопоатогенных грибов *Alternaria alternate, Aspergillus niger, Botrytis cinerea, Fusarium oxysporum, Monilia sp., Mucor sp., Penicillum lividum, Trichoderma viridae* Определение фунгицидной активности композиций проводили по методике [5]. Основываясь на результатах исследования биологической активности индивидуальных ЧАС, в качестве компонента для составления биоцидных композиций с использованием в качестве синергиста ИТК была выбрана двойная четвертичная аммонийная соль бифенила, конкретно, N-[(4´-{[диметил(октил)аммонио)метил}[1,1´-бифенил]-4-ил)-метил]-N,N-иметил-N-октиламмоний дихлорид. Исследованы композиции при следующих соотношениях ЧАС:ИТК = 2,5:1 – 0,6:1.

В результате цикла проведенных лабораторных испытаний установлено, что введение синергиста 4,5-дихлоризотиазол-3-карбоновой кислоты позволяет существенно снизить рабочие концентрации препаратов и при этом повысить их фунгицидную активность на 40%. Наибольший синергический эффект ЧАС и ИТК наблюдался в отношении 3-х видов фитопатогенных грибов - *Aspergillus niger, Fusarium oxysporum, Botrytis cinerea.*

Коэффициент ингибирования роста мицелия (RF, %)	Время, мин	Соотношение компонентов ЧАС:ИТК (мкг/мл)						
		50:0	**50:20**	*25:0*	**25:20**	*12,5:0*	**12,5:10**	**0:20**
Aspergillus niger	72	100	100	60	100	20	60	0
	96	100	100	43	100	30	100	0
Fusarium oxysporum	72	80	100	80	100	80	80	0
	96	86	100	86	100	77	77	0
Botrytis cinerea	72	100	100	100	100	80	92	0
	96	100	100	93	100	75	87	0

Литература:

1. Пат. РФ 2030153.10.03.1995. Фунгицидный синергитический состав. В.И.Абеленцев, А.Д.Альтов, Б.Ф.Егоров, В.Ф.Удальцов, М.И.Черкашин, В.Д.Шеповалов.
2. Пат РБ 14430. 28.02.2011. Четвертичные аммониевые соли замещенных бифенилов, обладающие фунгицидной активностью.
3. WO 03/069995 A1; WO 2004/058723 A1.
4. *Р.В Кабердин , В.И. Поткин , Ю.А. Ольдекоп* // Синтез и некоторые реакции 3-хлорметил-4,5-дихлоризотиазола - /ЖОрХ. 1990. Т. 26. Вып. 7. С. 1560-1566; Пат. BY 11593 C1. 28.02.2009. Бинарная инсектицидная композиция.
5. Методические рекомендации по испытанию химических веществ на фунгицидную активность под ред. Андреевой Е.И., Картомышевой В.Г. Черкассы. 1990. 63 с.

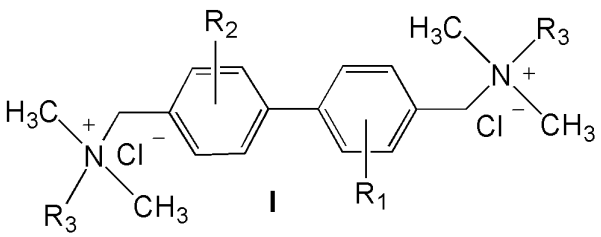
FUNGICIDAL SYNERGETIC COMPOSITE ON THE BASIS OF BIPHENYL CONTAINING QUATERNARY AMMONIUM SALTS

[1]Olkhovik V.K., [2]Zheldakova R.A., [1]Kalechyts G.V., [3]Zubenko Yu.S., [3]Potkin V.I.

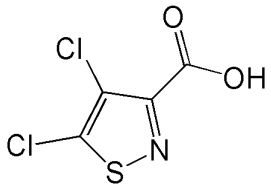
[1]Institute of Chemistry of New Materials NAS of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: slavol@ichnm.basnet.by
[2]Belarusion State University Minsk, Belarus.
[3]Institute of Physical-organic Chemistry NAS Belarus, Minsk, Belarus.

Currently, the problem of combating with microorganisms that provoking infection of humans and animals, with biodestruction of materials, equipment biofouling, etc. is highly relevant, despite the fairly wide range of biocidal products. Promising way of controlling fungal lesions of different materials and plants is a shift to the use of biocidal compositions, for example, quaternary ammonium salts (QAS) with synergists [1].

We have previously found that the quaternary ammonium salts of 2,4,4'-substituted biphenyls **(I)** exhibit high antimicrobial and fungicidal activity [2]. Another group of biphenyl derivatives possessing of high fungicidal activity is amides of heterocyclic carboxylic acids and 2-aminobiphenyls [3]. In order to increase fungicidal activity of QAS based on 2,4,4'-substituted biphenyls **(I)** we have investigated the fungicidal properties of compositions of the most active QAS with 4,5-dichlorisothiazole-3-carboxylic acid (ITA) **(II)** [4].



I



II

The test objects of the study were the following strains of phytopathogenic fungi - *Alternaria alternate, Aspergillus niger, Botrytis cinerea, Fusarium oxysporum, Monilia sp., Mucor sp., Penicillum lividum, Trichoderma viridae.* Determination of the fungicidal activity of the compositions was carried out as described in [5]. Based on the results of investigation of biological activity of individual QAS we selected the most active N-[4'-[dimethyl(octyl)ammonio]methyl-2'-(hexyloxy)[1,1'-biphenyl]-4-yl]methyl-N,N-dimethyl-1-octanaminium dichloride as QAS component of compositions with ITA. The compositions with QAS:ITA ratio from 2,5:1 up to 0,6:1 were tested.

After laboratory tests of the synergic compositions it was found the introduction as synergist 4,5-dichlorisothiazole-3-carboxylic acid allowing significantly reduce a working concentrations of the preparations and in the same time increase fungicidal activity by 40%. The greatest synergic effect QAS and ITA was observed for 3 species of phytopathogenic fungi – *Aspergillus niger, , Fusarium oxysporum, Botrytis cinerea.*

Coefficient of inhibition of mycelium growth (RF, %)	Time, min	Ratio of components QAS:ITA (mcg/ml)						
		50:0	**50:20**	*25:0*	**25:20**	*12,5:0*	**12,5:10**	**0:20**
Aspergillus niger	72	100	100	60	100	20	60	0
	96	100	100	43	100	30	100	0
Fusarium oxysporum	72	80	100	80	100	80	80	0
	96	86	100	86	100	77	77	0
Botrytis cinerea	72	100	100	100	100	80	92	0
	96	100	100	93	100	75	87	0

References:
1. Pat. RU 2030153.10.03.1995.
2. Pat. BY 14430. 28.02.2011.
3. WO 03/069995 A1; WO 2004/058723 A1.
4. Pat. BY 11593 C1. 28.02.2009.
5. Methodical recommendations on testing chemicals for fungicidal activity. *Andreeva E.I., Kartomisheva V.G. Cherkassi,*1990.63 pp.

ИЗУЧЕНИЕ БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ОКСИМОВ ИЗАТИНОВ

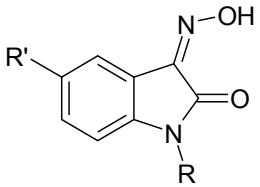
Отурина И.П., Фомина М.Н., Курьянов В.О.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
e-mail: irina.oturina@mail.ru

Появление штаммов патогенных бактерий, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, обусловливает необходимость поиска новых антимикробных средств, обладающих выраженным бактерицидным эффектом. Особый интерес для исследований представляют производные изатинов индольной природы, не имеющие аналогов среди огромного количества антибиотиков.

Изатины – низкомолекулярные эндогенные пептиды, обнаруживаемые практически во всех органах, тканях и биологических жидкостях животных и человека [1]. Эти соединения традиционно используются как лекарственные препараты, пестициды, стимуляторы роста растений, аналитические реагенты [2]. Химическая модификация изатинов за счет присоединения к ним активных радикалов позволит получить новую группу биологически активных препаратов с защищенной от воздействия бактериальных энзимов структурой молекул.

Целью данной работы явилось изучение уровня антимикробной активности оксимов изатинов в отношении штаммов $Г^+$ и $Г^-$ бактерий.



Структурная формула оксимов изатинов

Наличие бактериостатического эффекта оксимов изатинов оценивалось методом диффузии в агар с использованием бумажных дисков, пропитанных растворами испытуемых препаратов в концентрациях 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0, 30,0 и 50,0 мг/л. В качестве растворителя оксимов изатинов использовался диметилсульфоксид (ДМСО). Диски помещали в чашки Петри на поверхность агаризованной питательной среды (сухой питательный рыбный бульон, агар, крахмал, Na_2HP0_4; pH 7,4 ± 0,2), в которые предварительно методом сплошного газона были высеяны микроорганизмы определенных видов. Культуры инкубировались в течение суток в термостате при 37° С.

В ходе проведенных экспериментов обнаружена зависимость между особенностями химической структуры оксимов изатинов (наличия активных радикалов, их расположения, формы сочетания в молекуле) и биологическим действием этих соединений.

Установлено, что $Г^+$ бактерии *(Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus)* проявляют большую чувствительность к препаратам данной группы. Антимикробный эффект действия испытанных препаратов был сопоставим с влиянием на рост названных культур таких антибиотиков, как пенициллин, ампициллин, ванкомицин, ципрофлоксацин, оксациллин, полимиксин. Диаметр зоны задержки роста вокруг дисков составлял в среднем 17,4-48,4 мм. $Г^-$бактерии *{Escherichia coli, Proteus vulgaris)* были умеренно устойчивыми к воздействию данных препаратов ДЗЗР – 12,6-14,4 мм). Разная степень устойчивости бактерий к исследуемым препаратам определяется видовыми особенностями микроорганизмов, различиями в строении их поверхностных структур, а также наличием в бактериальных клетках комплементарных рецепторов.

Литература:

1. *И.П. Ашмарин, М.Ф. Обухова, М.В. Белопольская, Е.В. Шмальгаузен, Р.А. Данилова, О.И. Рудько..*// Индукция аутоиммунитета к эндогенным нейрорегуляторам изатину и холецистокинину – путь к моделированию и коррекции депрессивного поведения. – Нейрохимия, 2006, N3, с. 228-233.
2. *Г.И. Жунгиету, М.А. Рехтер.* Изатин и его производные. – Кишинев: Штиинца, 1977. – 227 с.

STUDY OF BACTERIOSTATIC ACTIVITY IZATIN OXIMES

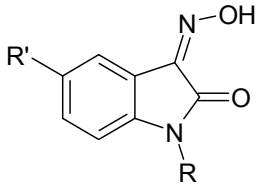
Oturina I.P., Fomina M.N., Kuryanov V.O.

Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Ukraine.
e-mail: irina.oturina@mail.ru

The emergence of strains of pathogenic bacteria with multidrug resistance causes necessity of search of the new antimicrobial agents possessing expressed bactericidal effect. Of particular interest for investigations are derivatives of indole isatin, which have no analogues among the vast number of antibiotics.

Isatins – endogenous low molecular weight compounds which are found in virtually all organs, tissues and body fluids of animals and humans [1]. Drugs isatin are traditionally used as medicines, pesticides, plant growth stimulators, analytical reagents [2]. Chemical modification of isatins by acceding to the active radicals will get a new group of biologically active compounds with a protected from exposure to the bacterial enzyme structure of molecules.

The purpose of this study was to examine the levels of antimicrobial activity of isatin oximes against strains of G^+ and G^- bacteria.



The structure formula of isatin oximes

Bacteriostatic effect of isatin oximes was evaluated by diffusion in agar with paper disks impregnated with solutions of tested drugs at concentrations of 5.0 mg / ml. The solvent isatin oximes used dimethylsulfoxide (DMSO). Discs were placed in Petri dishes on the surface of agar medium (dry nutritious fish broth, agar, starch, Na_2HPO_4; pH 7,4 ± 0,2), in which preliminary method of continuous grass were sown in certain species of microorganisms. Cultures were incubated for one day in the thermostat at 37^0 C.

During the conducted experiments the relationship between the characteristics of the chemical structure of isatin oximes (presence of active radicals, their location, form a combination in the molecule) and biological effects of these compounds was revealed.

Established that the G^+ bacteria (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*) are more sensitive to drugs of this group. The antimicrobial effect of tested compounds was comparable with the effect on the growth of these microorganisms such antibiotics as penicillin, ampicillin, vancomycin, ciprofloxacin, oxacillin, polymyxin. Diameter of zone growth inhibition (DZGI) around the disk averaged 17,4-48,4 mm. G^- bacteria (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*) were moderately resistant to these drugs (DZGI – 12,6-14,4 mm). Different degrees of bacterial resistance to the investigational isatin oximes is determined by the specific features of microorganisms, the differences in their surface structures, as well as the presence in bacterial cells of complementary receptors.

References:

1.*Г.И. Жунгиету, М.А. Рехтер* Изатин и его производные. – Кишинев: Штиинца, 1977, 227 с.
2.*И.П. Ашмарин, М.Ф. Обухова, М.В. Белопольская, Е.В. Шмальгаузен, Р.А. Данилова, О.И. Рудько*// Индукция аутоиммунитета к эндогенным нейрорегуляторам изатину и холецистокинину – путь к моделированию и коррекции депрессивного поведения. – Нейрохимия, 2006, N3, с. 228-233.

ВЛИЯНИЕ ИНСЕКТИЦИДА ТАНРЕК НА ПЛОДОВИТОСТЬ *DAPHNIA MAGNA* STRAUS (CLADOCERA)

Папченкова Г.А.

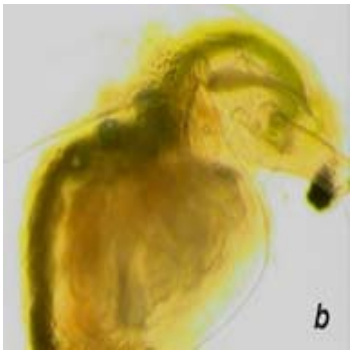
Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, Борок, Россия
e-mail: gala_al@mail.ru

Исследовалось воздействие инсектицида Танрек на *Daphnia magna*. Танрек – системный инсектицид из класса неоникотиноидов (действующее вещество имидаклоприд) – рекомендован для применения в сельском хозяйстве для защиты от колорадского жука, от комплекса сосущих вредителей, а также уничтожения саранчовых. Обладает острым контактно-кишечным действием, воздействует на нервную систему вредителей. Выпускается в виде водорастворимого концентрата.

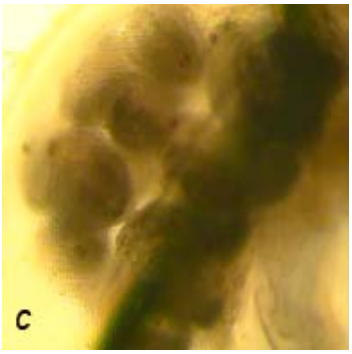
Эксперимент проводился на культуре *D. magna*, размножающейся в лаборатории партеногенезом. Использовалась только что отродившаяся молодь, возраст которой не превышал 24 часа (рис. *a*). Рачки экспонировались в растворах токсиканта в диапазоне концентраций (С) $1x10^{-3}$М–10^{-23}М. Воздействие токсиканта оценивалось по гибели дафний и степени развития яичников, которые у *D. magna* в виде парных трубок тянутся по сторонам кишечника, открываясь короткими яйцеводами в выводковую камеру [1]. При С=10^{-3}М–10^{-4}М дафнии погибли на 1–2 сутки. Рачки, экспонируемые при более низких концентрациях токсиканта, выживали, но их развитие значительно отличалось от контрольных рачков, экспонируемых в воде. Влияние инсектицида на репродукцию дафний отмечалась уже на стадии оогенеза.

< 24 часа

Так, на третий день эксперимента у контрольных рачков (*рис. b)* в яичнике явственно просматривалась цепочка созревающих ооцитов в отличие от экспонируемых в токсиканте особей *(рис. e),* у которых ооциты в яичниках не созревали и не запаслись желтком. На 7-ой день эксперимента у контрольных особей яйца переместились в выводковую камеру (*рис. c*), развились до подвижных эмбрионов, готовых покинуть камеру, в яичнике началась вторая волна созревания ооцитов. У особей, экспонируемых в токсиканте (*рис. f*), в яичнике по-прежнему отсутствовали развивающиеся ооциты. Лишь к десятому дню экспозиции в них стал наблюдается рост и вителлогенез ооцитов (*рис. g*). В это время у контрольных особей в яичниках созревала уже третья генерация ооцитов (*рис. d*). Таким образом, Танрек снижает плодовитость рачков.



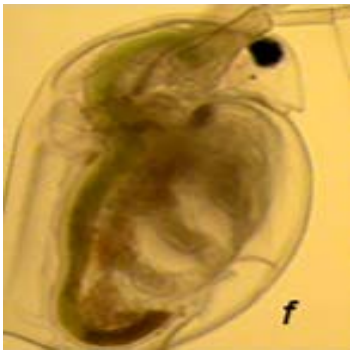
3 сутки



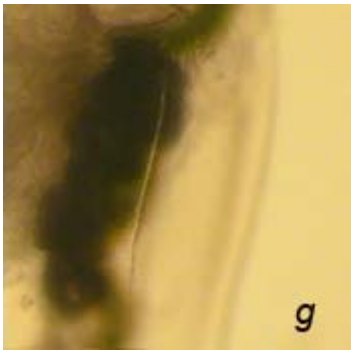
7 сутки

10 сутки

3 сутки



7 сутки



10 сутки

Рис. Степень развития яичников *Daphnia magna*: *b*, *c*, *d* - экспозиция в чистой воде (контроль); *e*, *f*, *g* – in инсектициде Танрек при концентрацией 10^{-7}М.

Литература:

1.*R.H. Peters, R. De Bernardi.* // Daphnia – Memorie Dell'istituto Italiano Di Idrobiologia, Vol. 45, 1987, 502 pp.

INFLUENCE OF THE INSECTICIDE TANREC ON THE REPRODUCTION OF *DAPHNIA MAGNA* STRAUS (CLADOCERA)

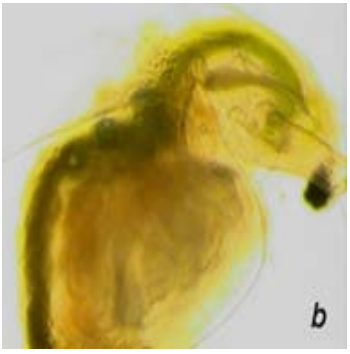
Papchenkova G.A.

I.D. Papanin Institute of Inland Waters Biology, Russian Academy of Sciences, Borok, Yaroslavl Region
e-mail: gala_al@mail.ru

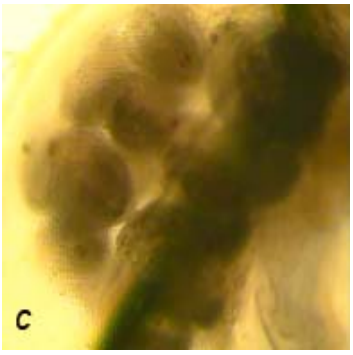
This study shows the influence of the insecticide Tanrec on the reproduction of *Daphnia Magna*. Tanrec is a Systemic insecticide belonging to the class of Neonicotinoids. The active substance is Imidacloprid. It is possibly the most widely used insecticide, in the world market. It is now applied against soil, seed, timber and animal pests as well as foliar treatments for crops including: cereals, cotton, grain, legumes, potatoes, pome fruits, rice, turf and vegetables. It is systemic with particular efficacy against sucking insects and has a long residual activity. Neonicotinoids act on the central nervous system of insects. Experiment was conducted on culture *D. Magna*, reproduced in laboratory parthenogenetically. The study used the newly hatched Daphnia the age didn't exceed 24 hours (fig. *a*).

Daphnis were exposed to varying concentrations (C) of the substance $1x10^{-3}$M-$1x10^{-23}$M. Toxic influence was estimated by the destruction of *D. Magna* and by stages of development of ovaries, which looks like a pair of tubes beside the intestines. The short oviducts are open into the brood pouch [1]. When C=10^{-3}M-10^{-4}M Daphnis are dying after 1-2 days. Animals in the tests with lower toxic concentration, survived, but their development differed considerably from the control group in clean water. The influence of the insecticide on reproduction of Daphnia can be early recognizable at the stage of oogenesis. On the third day the specimens in the control group (fig. *b*) had in their ovaries the chain of ripening oocytes. At the same time oocytes of Daphnia in toxic solution (fig. *e*) weren't ripened and reserved a yolk. At 7th day of the study eggs of the control group moved into the brood pouch (fig. *c*). They have developed into the mobile embryos, ready to leave the brood pouch. The second wave of maturing oocytes has begun to form in the ovaries. Daphnia from toxic solution (fig. *f*) still did not have developing oocytes in their ovaries. Vitellogenesis there started only on 10th day (fig. *d*). This study shows that Tanrec reduces the reproduction of *Daphnia Magna*.

< 24 hours



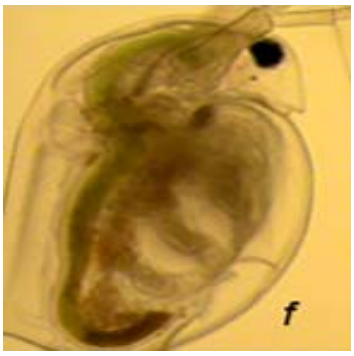
3rd day



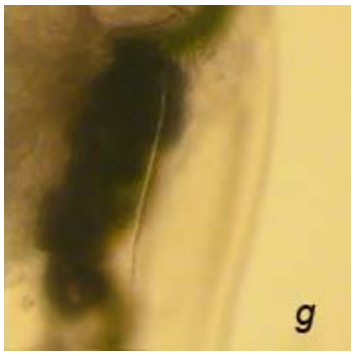
7th day

10th day

3rd day



7th day



10th day

Fig. Degree of development of ovaries *Daphnia magna*: *b*, *c*, *d* - exposition in clean water (control group); *e*, *f*, *g* – in insecticide Tanrec of concentration 10^{-7}M.

References:
1.*R.H. Peters, R. De Bernardi.* // Daphnia – Memorie Dell'istituto Italiano Di Idrobiologia, Vol. 45, 1987, 502 pp.

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ТОКА НА АКТИВНОСТЬ ТРИПТОФАН ДЕКАРБОКСИЛАЗЫ И СОДЕРЖАНИЕ ТРИПТАМИНА В КЛЕТКАХ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ *VINCA MINOR*

Ромашко С.Н., Молчан О.В., Юрин В.М.

Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь,
e-mail: svetlan_rom@mail.ru

Барвинок малый (*Vinca minor* L.) представляет собой ценное лекарственное растение с широким спектром фармакологического действия. В его листьях обнаружено более 50 алкалоидов индольного ряда, винкамин, винцин, винкаминин и др. [1]. В настоящее время, на основе растительного сырья *V. minor* выпускается ряд препаратов, обладающих гипотензивными, сосудорасширяющими, седативными и другими свойствами. Кроме того, предполагается, что в траве барвинка малого содержатся соединения, сходные по своей структуре с бис-индольными алкалоидами *Catharanthus roseus*, обладающие антинеопластической активностью [2].

Каллусная культура барвинка малого представляет собой уникальный экологически чистый источник вышеуказанных фармакологически активных соединений. Однако известно, что содержание вторичных метаболитов в культурах *in vitro* находится на крайне низком уровне, что является предпосылкой для разработки различных методов стимуляции их биосинтеза. Одним из уникальных методов, позволяющих повысить биосинтетическую активность клеток *in vitro*, является воздействие слабого электромагнитного поля. Так, известно, что влияние данного поля на растения может приводить к различным биологическим эффектам на клеточном, тканевом и органном уровнях, которые могут заключаться в активации процессов роста и вторичного метаболизма [3]. Данные обнаруживаемые эффекты могут быть функционально связаны с процессами внутриклеточной сигнальной трансдукции, регулирующими, например, изменения $[Ca^{2+}]_{цит}$ [4]. Однако, полностью механизм воздействия слабого электромагнитного поля на биологические системы до сих пор не раскрыт.

Биосинтез индольных алкалоидов терпенового ряда начинается реакцией декарбоксилирования триптофана и превращения его в триптамин. Реакцию катализирует фермент триптофан декарбоксилаза (ТДК). В наших исследованиях была изучена активность ТДК и содержание продукта, катализируемой им реакции – триптамина в клетках, при пропускании через каллусную ткань *V. minor* постоянного тока силой 1,5 мкА на 10, 20, 30, 40 и 50-е сутки инкубации.

Каллусную культуру *V. minor* инкубировали в темноте при 25°С на среде MS, содержащей 1 мг/л кинетин и 1 мг/л НУК. Электрический ток, силой в 1,5 мкА с помощью двух электродов пропускали через каллусную ткань в течение двух суток на различных фазах ростового цикла. Определение активности ТДК и содержание триптамина в каллусной ткани проводили сразу же после отключения тока по методам, описанным Sangwan et al., 1998.

В результате наших экспериментов, было показано, что стимуляция электрическим током приводит к существенному повышению активности ТДК и содержания триптамина в каллусных клетках *V. minor* на экспоненциальной фазе роста, соответствующей периоду наибольшей метаболической активности клеток. Так, наибольшая активность ТДК под воздействием электрического тока наблюдалась на 20-е сутки инкубации каллусной ткани и составляла более 50% по отношению к контролю. В то же время, на стационарной фазе роста каллусной ткани *V. minor* воздействие электрического тока уже не вызывало каких-либо статистически закономерных изменений в активности ТДК по отношению к контрольным вариантам. Кроме того, было изучено влияние силы электрического тока на начальные этапы биосинтеза алкалоидов. Показано, что при увеличении силы тока от 0,5 до 2,5 мкА активность ТДК незначительно понижалась. Так, активность фермента в каллусной ткани барвинка малого, при воздействии электрического тока силой 0,5 мкА была почти на 20% больше, чем активность фермента при электростимуляции силой 2,5 мкА. Было установлено также, что при электростимуляции активность ТДК коррелирует с содержанием эндогенного триптамина в ткани на всех этапах ростового цикла.

Таким образом, можно заключить, что воздействие электрического тока малой силы приводит к стимуляции начальных этапов биосинтеза алкалоидов индольного ряда в каллусной культуре барвинка малого. Кроме того, метаболический ответ каллусных клеток *V. minor* на экзогенное воздействие данного фактора зависит от фазы ростового цикла, а именно от уровня метаболической активности клеток.

Литература:

1. *Tanaka N.* Vincamine production in multiple shoot culture derived from hairy roots of *Vinca minor* / N. Tanaka [et al.] // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 1995. – Vol. 41. – P. 61–64.
2. *Khanavi M.* Cytotoxicity of *Vinca minor* / M. Khanavi1 [et al.] // Pharmaceutical biology.–2010.–Vol.48.–P.96–100.
3. *Ye H.* Pulsed electric field stimulates plant secondary metabolism in suspension cultures of *Taxus chinensis* / H. Ye [et al.] // Biotechnol Bioeng. – 2004. – Vol. 88, № 6. – P. 788-795.
4. *Goldsworthy A.* Effects of electrical and electromagnetic fields on plants and related topics / A. Goldsworthy // Plant Electrophysiology – Theory and Methods / A. Goldsworthy ; ed. by A. G. Volkov. – Berlin. – 2006. – Chap. 11. – P.247–267.

THE INFLUENCE OF WEAK ELECTRIC CURRENT ON THE TRYPTOPHAN DECARBOXYLASE ACTIVITY AND TRYPTAMINE CONTENT IN CALLUS CULTURE OF *VINCA MINOR*

Romashko S.N., Molchan O.V., Yurin V.M.

Belarussian State University, Minsk, Belarus
e-mail: svetlan_rom@mail.ru

The Lesser Periwinkle (*Vinca minor* L.), a member of Apocynaceae, is a medicinal plant with the broad spectrum of pharmacological activity. More than 50 indole alkaloids have been isolated from the aerial part of the plant. The main alkaloid of *Vinca minor* leaves is vincamine. Other alkaloids of this plant are vincine, vincaminine and vincinine [1]. Vincamine and its derivatives are widely used in medicine for the prevention and treatment of cerebrovascular insufficiencies and disorders. It has been shown to be pharmacologically active in the central nervous system and in the cardiovascular system but its activity is mainly on the vessels of the brain. Also vincamine and its derivatives improve a person's memory, thinking capacity and used as sedative drug. Furthermore, it is supposed that some of *Vinca minor* alkaloids have bis-indole structure such as the antineoplastic alkaloids present in *Catharanthus roseus* and show a dose-dependent cytotoxic effect on human cancer cell lines [2].

Callus culture of Lesser Periwinkle represents a potential renewable ecological source of pharmacologically valuable medicinal compounds. But indole alkaloids biosynthesis in callus tissues of *Vinca minor* suffers from a low productivity of vincamine. Thereby, stable, high production rates of vincamine have not been achieved in such unorganized cell culture. Thus, high market value and low yield of these substances in callus tissues had caused investigation of alkaloid biosynthesis stimulation in callus culture of *Vinca minor*.

Application of exogenous electromagnetic field is unique method allows researchers to improve a biosynthetic capacity of *in vitro* cells. It is known that different biological effects (for example growth and metabolism activation) may be caused by influence of weak electric field on plants [3]. It is considered that electromagnetically induced changes in membrane permeability affect metabolism principally by allowing calcium to enter the cytosol down a very large electrochemical gradient, where they give a variety of effects by interfering with cell signaling [4].

Terpenoid indole alkaloid biosynthesis starts with the decarboxylation of tryptophan to the tryptamine. Tryptophan decarboxylase (TDC) is the enzyme that catalyzes this conversion. We have detected the activity of TDC and tryptamine content in *Vinca minor* callus tissues under application of weak electric current in 10-, 20-, 30-, 40- and 50-day-old calli.

Callus cultures of Lesser Periwinkle were incubated in the dark at 25°C on MS medium supplemented with growth regulators (1 mg/l kinetine and 1 mg/l NAA). Weak electric current of the order of 0,5-2,5 μA with help of two electrodes was passed through callus tissues during 2 days. TDC activity and tryptamine content were measured as described Sangwan et al., 1998.

It was shown that treatment with a weak electric field of *Vinca minor* callus tissues significantly increased TDC activity and tryptamine content in cells during exponential phase of growth which correspond to the highest metabolic activity. Thus, the maximum TDC activity in cells (50% in comparison with untreated callus) under influence of weak electric field was observed in 20-day-old calli. On the other hand, the treatment of *Vinca minor* callus with a weak electric field during stationary phase of growth did not induce the changes in TDC activity. In addition, the dependence of enzyme activity on current intensity was investigated. It was revealed that the increase of current intensity (from 0,5 to 2,5 μA) induced insignificant decrease (20%) in enzyme activity. Analysis of endogenous tryptamine content at different phases of growth cycle under influence of weak electric field showed that tryptamine accumulation correlated with TDC activity.

By summarizing the above results, we could conclude that weak electric field stimulates the initial step of the indole alkaloids biosynthetic pathway in *Vinca minor* callus culture. Besides, the metabolic response of callus cells to treatment of weak electric field is under strict developmental regulation and depends on the phase of growth cycle notably on the rate of cells metabolism.

References:

1. *Tanaka, N.* Vincamine production in multiple shoot culture derived from hairy roots of *Vinca minor* / N. Tanaka [et al.] // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 1995. – Vol. 41. – P. 61–64.
2. *Khanavi M.* Cytotoxicity of *Vinca minor* / M. Khanavi1 [et al.] // Pharmaceutical biology.–2010.–Vol.48.–P. 96–100.
3. *Ye, H.* Pulsed electric field stimulates plant secondary metabolism in suspension cultures of *Taxus chinensis* / H. Ye [et al.] // Biotechnol Bioeng. – 2004. – Vol. 88, № 6. – P. 788-795.
4. *Goldsworthy A.* Effects of electrical and electromagnetic fields on plants and related topics / A. Goldsworthy // Plant Electrophysiology – Theory and Methods / A. Goldsworthy; ed. by A. G. Volkov. – Berlin. – 2006. – Chap. 11. – P.247–267.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ МИКРОБНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ

Самойлова З.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

[1]Учреждение РАН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия
e-mail: samzu@mail.ru

В связи с высокой биологической активностью экстракты растений, содержащие полифенолы (флавоноиды и таннины), являются объектами интенсивного изучения для специалистов разных отраслей науки – медицины, микробиологии, химии, физики. На сегодняшний день получено большое количество данных о положительном влиянии препаратов растительного происхождения на патологические состояния, вызванные или сопровождающиеся окислительным стрессом.

Существует огромное число методов оценки антиоксидантной активности (АОА), основанных на измерении способности субстратов нейтрализовать активные формы кислорода или же препятствовать их образованию. Однако зачастую такой подход никак не отражает характер взаимодействия испытуемых субстратов с живой клеткой, а именно, способности субстрата проникать внутрь клетки и оказывать какие-либо дополнительные эффекты.

Генно-инженерные штаммы бактерий *Escherichia coli* могут быть использованы как относительно простые тест-системы для оценки in vivo АОА экстрактов растений и в сочетании с физико-химическими методами определения АОА позволяют получить представление о механизмах их антиоксидантного действия в живых клетках.

Целью работы явилось исследование антиоксидантного действия водно-спиртовых экстрактов 14 растений на бактерии *E. coli*. Экстракты были предоставлены сотрудниками лаборатории фитохимии Центрального сибирского ботанического сада СО РАН.

Установлено, что предобработка бактериальных культур некоторыми экстрактами оказывала выраженное защитное действие на рост и выживаемость в условиях пероксидного стресса.
Наибольшее антиоксидантное действие отмечено у экстрактов хамериона, грушанки, лабазника и репейничка. Экстракты мелилотоидеса и конопли в наших условиях заметного защитного эффекта не проявили.

Выявлена положительная связь между способностью экстрактов снижать бактериостатическое действие H_2O_2 и их радикал-связывающей и металл-хелатирующей активностями in vitro ($r = +0{,}74$, $p < 0{,}01$). Коэффициенты корреляции между исследованными параметрами АОА и содержанием флавоноидов и таннинов в испытуемых экстрактах изменялись в пределах от + 0,53 до + 0,80, $p < 0{,}01$.

Известно, что в аэробно растущих культурах *E. coli* основной вклад в детоксикацию эндогенной H_2O_2 вносит каталаза-гидропероксидаза I (HPI), кодируемая H_2O_2-индуцибельным геном *katG*. Уровень экспрессии *katG* может служить одним из показателей активности антиоксидантной защиты бактериальной клетки. Для оценки влияния экстрактов на экспрессию *katG* измеряли активность β-галактозидазы в клетках *E. coli* NM111, несущих слияние *katG*::*lacZ*. Предобработка некоторыми экстрактами вызывала достоверное увеличение экспрессии *katG*::*lacZ* в 1,5-2 раза в отсутствие оксиданта, что указывало на возможное наличие у ряда испытуемых экстрактов прооксидантных свойств. Показано также, что в системе in vitro некоторые тестируемые экстракты образовывали пероксид с высокой скоростью. При этом, скорость продукции пероксида экстрактами коррелировала с и их способностью снижать бактерицидное действие H_2O_2 ($r = +0{,}90$; $p < 0{,}01$).

Наблюдаемое противоречие между способностью экстрактов продуцировать H_2O_2 и их антиоксидантным эффектом является кажущимся, поскольку малые дозы пероксида обладают адаптивным действием и стимулируют экспрессию антиоксидантных генов, что защищает клетки от последующей экспозиции к высоким концентрациям H_2O_2.

Полученные данные свидетельствуют, что антиоксидантное действие экстрактов растений может осуществляться с одновременным участием нескольких молекулярных механизмов: прямого ингибирования АФК в окружающей среде и цитоплазме; снижения продукции АФК за счет хелатирования ионов железа; стимуляции экспрессии антиоксидантных генов малыми дозами АФК, образующимися при аутоокислении изучаемых субстратов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-Урал № 10-04-96017 и гранта Президиума УрО РАН по Программе интеграционных исследований с СО РАН.

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY MECHANISMS OF PLANT EXTRACTS USING MICROBIAL TEST-SYSTEMS

Samoilova Z.Y., Smirnova G.V., Oktyabrsky O.N.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia
e-mail: samzu@mail.ru

Recently, plant extracts containing polyphenols such as flavonoids and tannins and exhibiting high antioxidant activity have been a subject of intensive research for the specialists of different fields – medicine, microbiology, chemistry and physics. Plant extracts have been shown to have protective effects against some pathologies accompanied or associated with oxidative stress.

There are lots of methods to evaluate antioxidant activity (AOA) based on a substrate's ability to neutralize reactive oxygen species or inhibit reactions of their formation. However, such approaches do not reveal the interaction mode of a substrate with a living cell, for example, the ability of a substrate to penetrate into the cell and cause some indirect effects.

Genetically engineered bacterial strains of *Escherichia coli* may be used as relatively simple test-systems to evaluate AOA of plant extracts in vivo and in combination with some physicochemical methods of AOA determination may provide a more detailed conception about mechanisms of antioxidant action of plant extracts in the living cells.

The aim of the work was to investigate the antioxidant action of 14 aqueous-ethanol plant extracts on bacteria *E. coli*. Plant extracts were provided by the collaborators from the Laboratory of Photochemistry of the Central Siberian Botanical Garden, Novosibirsk, Russia.

It has been established that pretreatment of bacterial cultures with some extracts caused a remarkable protective effect on bacterial growth and viability under peroxide stress. The highest antioxidant activity was observed in cases of *Chamerion angustifolium, Pyrola rotundifolia, Filipendula vulgaris* and *Agrimonia piloza*. The extracts of *Cannabis sativa* and *Melilotoides platycarpos* have not exhibited any considerable protective effects under these conditions.

A positive correlation was found between the extracts' ability to decrease bacteriostatic effect of H_2O_2 and their AOA in vitro – radical-scavenging and metal-chelating activities ($r = +0{,}74$, $p < 0{,}01$). Correlation coefficients among parameters studied and content of tannins and flavonoids varied from + 0,53 to + 0,80, $p < 0{,}01$.

One of the pathways of endogenous H_2O_2 detoxication in aerobically grown strains of *E. coli* is related to the functioning of catalase-hydroperoxidase I (HPI) encoded by H_2O_2-inducible gene *katG*. The level of *katG* expression may serve as an indicator of antioxidant activity of the bacterial cell. To evaluate the possible influence of the extracts on *katG* expression we measured β-galactosidase activity in the cells of *E. coli* NM111, carrying *katG*::*lacZ* fusions. It was found that pretreatment with some of the extracts caused a statistically significant 1,5-2-fold increase of *katG*::*lacZ* expression in the absence of oxidant. This observation might point out the prooxidant properties of some extracts. It has also been shown that in vitro some of the extracts tested produced peroxide with a high rate. At the same time, peroxide producing rate of the extracts correlated with their ability to decrease bactericidal action of H_2O_2 ($r = +0{,}90$; $p < 0{,}01$).

The observed contradiction between ability of the extracts to produce H_2O_2 and their antioxidant effects is seeming because low doses peroxide possess adaptive action and stimulate expression of antioxidant genes that provides cell protection during exposition to high doses of H_2O_2.

Our results indicate that antioxidant action of the plant extracts studied may be via simultaneous action of several mechanisms: direct inhibition of reactive oxygen species; decrease of their production due to iron chelation; stimulation of antioxidant gene expression by low doses of reactive oxygen species produced during autoxidation of the studied substrates.

This work was supported by the grant of "Programs of integration projects of Ural Division of Russian Academy of Sciences" and by the grant of Russian Fund of Fundamental Investigation RFFI-Ural № 10-04-96017.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБНЫХ ФИТАЗ В КОРМОПРОИЗВОДСТВЕ

Сапунова Л.И., Лобанок А.Г.

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: leonida@mbio.bas-net.by

Кормопроизводство сегодня – наукоемкий сектор агробизнеса с ежегодным мировым производством более 600 млн. тонн и торговым оборотом более 50 биллионов $ США. Именно использование современных технологий кормления и содержания животных является определяющим фактором рентабельности животноводческой отрасли сельскохозяйственного производства. Большие резервы увеличения производства продуктов животноводства связаны с повышением коэффициента полезного действия потребляемых животными кормов, многие питательные вещества которых находятся в трудно доступной форме. Например, в тканях растений в качестве резервного источника фосфора присутствует фитат – соль фитиновой кислоты, содержащей в своем составе 28,2% фосфора. Фитиновая кислота снижает активность пепсина и трипсина, образует комплексные соединения с крахмалом, белками, уменьшая тем самым их биологическую доступность и ухудшая пищеварение, формирует нерастворимые соли с кальцием, цинком, медью, кобальтом, марганцем, магнием, железом, делая их недоступными для усвоения. При этом транзитом через желудочно-кишечный тракт животных проходит и содержащийся в фитате фосфор. В результате этот незаменимый для роста животных элемент не только не усваивается, но и, выделяясь с экскрементами, накапливается в почве и поверхностных водах, что приводит к эутрофикации водоемов и наносит существенный экологический ущерб окружающей среде. Поэтому, несмотря на наличие в корме неорганического фосфора в виде фитата, возникает необходимость введения минерала в рационы животных с однокамерным желудком, что в животноводческой практике, несмотря на существенные материальные затраты, обычно и практикуется.

Для устранения антипитательного эффекта фитата кормопроизводители используют ферментные препараты, содержащие фитазу. В мировой практике производство ферментных препаратов с преобладанием фитазы до недавнего времени ограничивалось экономической нецелесообразностью их микробиологического производства из-за невысокой ферментативной активности штаммов-продуцентов. И только в последние годы препараты фитазы обозначились как самостоятельно существующий сегмент рынка ферментов для кормопроизводства. К концу 20 века продажи фермента в качестве кормовой добавки оценивались в 500 млн. долларов США, сегодня – около 1 млрд. долларов.

До недавнего времени в кормопроизводстве применяли фитазы природных штаммов мицелиальных грибов. В целом, свойства продуцируемых ими ферментов удовлетворяли требованиям кормопроизводителей, однако их невысокая удельная активность отрицательно сказывалась на себестоимости конечного продукта. Сегодня благодаря развитию генно-инженерных технологий сконструированы рекомбинантные штаммы с уровнем продукции ферментного белка в разы и даже на порядки более высоким, чем у родительских штаммов. Так, в мире для производства фитаз в промышленном масштабе используются следующие штаммы-продуценты – *Aspergillus niger* (BASF Animal Nutrition, Германия), *Aspergillus oryzae* (Novo Nordisk A/S, Дания), *Trichoderma reesei* (AB Enzymes, Германия), *Escherichia coli* (Danisco Animal Nutrition, Великобритания) и *Aspergillus niger* (Alltech Inc., США). Из них только последний не является рекомбинантным [1-4].

Использование рекомбинантных микроорганизмов, а также совершенствование ферментационных процессов позволили существенно снизить стоимость промышленного получения фитазы, приблизив ее рыночную цену к цене неорганического фосфата. Дополнительным экономически обоснованным аргументом в пользу использования фермента в кормопроизводстве явилась возможность увеличить ассортимент высококачественных кормов путем повышения в них доли фитатсодержащего компонента при частичном или полном отказе от использования в рационах животных неорганического фосфата. Юридическим посылом прогресса в использовании фитаз стало принятие закона, обязывающего производителей снижать объем фосфорсодержащих отходов с целью улучшения экологической ситуации в районах интенсивного животноводства.

Поэтому, несмотря на достигнутые в последние годы успехи в области получения и использования фитаз, в основном, грибных, ведутся работы не только по совершенствованию технологии и экономики существующих промышленных производств ферментных препаратов, но также по скринингу и селекции новых высокотехнологичных штаммов-продуцентов фитазы. Особое внимание при этом уделяется ферментам, активным и стабильным в широком диапазоне pH и температуры. Согласно данным литературы, указанным критериям отвечают фитазы бактерий, преимуществом которых являются также относительно высокие скорости роста и короткие сроки культивирования.

Литература:

1. *S. Haefner, A. Knietsch, E. Scholten, J. Braun, M. Lohscheidt, O. Zelder* // Biotechnological production and applications of phytases – Appl. Microbiol. Biotechnol., 2005, v. 68, N 5, p. 588-597.
2. *S. Fu, J. Sun, L. Qian, Z. Li.* // Bacillus phytases: present scenario and future perspectives – Appl Biochem Biotechnol. 2008, v. 151, N 1, p. 1-8.
3. *D.E. Rao, K.V. Rao, T.P. Reddy, V.D. Reddy* // Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases – Crit. Rev. Biotechnol., 2009, v. 29, N 2, p. 182-198.
4. *A.S. Meyer* // Enzyme technology for precision functional food ingredient processes – Ann. N.Y. Acad. Sci., 2010, v. 1190, p. 26-32.

APPLICATION OF MICROBIAL PHYTASES IN FODDER PRODUCTION

Sapunova L.I., Lobanok A.G.

Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences, Minsk, Belarus
e-mail: leonida@mbio.bas-net.by

Production of fodder today is a technologically advanced sector of agribusiness with global annual output over 800 mln tons and trade turnover over 50 bln US dollars. Use of up-to-day procedures of feeding and rearing farm stock is a governing factor of agro sector profitability. Huge reserves in technology of manufacturing farm products may be mobilized by increasing digestibility of consumed feed, where many nutrients are in hardly accessible form. For instance, plant tissues accumulate phytate (myoinositolhexacis-phosphate) – a salt of phytic acid incorporating 28.2% phosphorus as a reserve P source. Phytic acid decreases pepsin and trypsin activity, and generates complexes with starch and proteins, reducing thereby their biological availability and affecting metabolic processes, forms insoluble salts with calcium, zinc, copper, cobalt, manganese, magnesium, iron complicating their assimilation. Phosphorus contained in the phytate passes through gastrointestinal system in a transitory manner. As a result this element indispensible for growth and development of animals is not assimilated but excreted into the environment, builds up in soil and surface waters resulting in eutrophication of water basins and aggravation of ecological situation. Therefore, despite presence of inorganic phosphorus as phytate in supplied fodder, it is necessary to introduce the mineral into feed rations which is a common practice in stock breeding, although it implies substantial extra expenses.

To eliminate phytate antinutritive effect fodder manufacturers use enzyme preparations comprising phytase. So far global output of phytase-based enzyme preparations has been restrained by economic reasons: low activity of strains-producers. Only in recent years phytases occupied a significant niche of fodder enzyme market. By the end of 20 century commercial potential of the enzyme as fodder supplement was estimated at 500 mln US dollars, today – around 1 bln dollars.

Traditionally phytases derived from native strains of mycelial fungi were engaged in fodder-production. Enzyme characteristics generally met technological criteria, yet their relatively low specific activity negatively affected cost of the end product. Now due to progress of genetic engineering technologies recombinant strains have been constructed with level of enzyme synthesis superior to that in parent strains by several times or even orders.

The following strains-producers are applied on a large scale for phytate production: *Aspergillus niger* (BASF Animal Nutrition, Germany), *Aspergillus oryzae* (Novo Nordisk A/S, Denmark), *Trichoderma reesei* (AB Enzymes, Germany), *Escherichia coli* (Danisco Animal Nutrition, Great Britain) and *Aspergillus niger* (Alltech Inc., USA). Only the last in the list is not recombinant [1-4].

Use of recombinant microorganisms and innovations in fermentation technologies allowed to cut drastically the cost of phytase industrial fabrication, matching the enzyme market price to the price of inorganic phosphate. Additional economically motivated argument in favour of enzyme application for feed manufacturing is possibility to broaden the range of high-quality nutrients by raising the ratio of phytate component and concomitant partial or total replacement of inorganic phosphate in feed rations. A legal ground promoting phytase application is adoption of legislative standards committing manufacturers to drop the amount of phosphoric wastes and alleviate ecological stress in areas of intensive stock breeding.

In spite of the latest advances in generation and application of microbial phytases, namely of fungal origin, the studies are under way to rationalize technologies and economics of existing enzyme fabrication schemes, to screen and select novel technologically superior strains – phytase producers. Special emphasis is focused on enzymes retaining activity and stability in wide pH and temperature range. According to literature data, afore-mentioned criteria are met by phytases of bacteria distinguished by relatively high growth rate and short fermentation period.

References:

1. *S. Haefner, A. Knietsch, E. Scholten, J. Braun, M. Lohscheidt, O. Zelder* // Biotechnological production and applications of phytases – Appl. Microbiol. Biotechnol., 2005, v. 68, N 5, p. 588-597.
2. *S. Fu, J. Sun, L. Qian, Z. Li.* // Bacillus phytases: present scenario and future perspectives – Appl Biochem Biotechnol. 2008, v. 151, N 1, p. 1-8.
3. *D.E. Rao, K.V. Rao, T.P. Reddy, V.D. Reddy* // Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases – Crit. Rev. Biotechnol., 2009, v. 29, N 2, p. 182-198.
4. *A.S. Meyer* // Enzyme technology for precision functional food ingredient processes – Ann. N.Y. Acad. Sci., 2010, v. 1190, p. 26-32.

ПРОДУЦИРОВАНИЕ ИНДОЛИЛ-3-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ РИЗОСФЕРНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Сафронова Г.В.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
e-mail: hsafronava@mail.ru

В настоящее время известно, что симбиотические, ассоциативные и свободноживущие микроорганизмы, обладающие ростостимулирующим эффектом, продуцируют ауксины [1]. В связи с этим нами изучена способность диазотрофных и фосфатмобилизующих ризосферных бактерий-ростстимуляторов зерновых, бобовых, овощных и крестоцветных культур к синтезу β-индолил-3-уксусной кислоты.

Результаты количественного анализа фитогормона показали варьирование содержания индольного соединения в культуральной жидкости ризобиальных штаммов (табл. 1). Максимальное количество гетероауксина продуцировали штаммы *R. leguminosarum bv. pisum* 3021 и 5114 (32,8 и 40,3 мкг β-ИУК/мл). Другие штаммы синтезировали 21,3–31,0 мкг β-ИУК/мл культуральной жидкости.

Таблица 1. Содержание β-ИУК в культуральной жидкости штаммов ризосферных бактерий

R. leguminosarum bv. pisum		Ассоциативные диазотрофы		Фосфатмобилизующие бактерии	
		Kl. planticola 5	*Enterobacter sp.* 11	*Streptococcus sp.* 35	*Bacillus sp.* 46
№ штамма	Концентрация β-ИУК, мкг/мл				
250а (эталон)	26,0 ± 1,47	45,3 ± 0,08	19,0 ± 0,06	73,3 ± 0,67	20,3 ± 0,83
3021	32,8 ± 0,77				
3733	30,3 ± 0,88				
4703	21,3 ± 0,67				
4544	23,5 ± 0,50				
5114	40,3 ± 2,36				
5424	31,0 ± 0,91				
$НСР_{0,95}$	1,30	1,25			

Способность к ауксиногенезу выявили также у ассоциативных диазотрофных и ФМ-бактерий. Эти микроорганизмы синтезировали 19,0–73,3 мкг β-ИУК/мл культуральной жидкости.

Количество фитогормона, продуцируемое чистыми культурами ассоциативных ризобактерий, в значительной степени зависело от состава среды культивирования (табл. 2). Уровень синтеза β-ИУК в 2,8–3,1 раза выше при использовании безазотной среды [2], чем минимальной тест-среды [3]. Внесение в среду культивирования триптофана в количестве 1мМ приводило к усилению продукции индольного соединения в 6,6–8,2 раза, а максимальное количество ауксина энтеробактерии синтезировали в стационарной фазе роста – через трое суток после инокуляции.

Таблица 2. Продуцирование β-ИУК ассоциативными диазотрофами

Вариант опыта	Питательная среда			
	тест-среда	безазотная	тест-среда + L-trp (1мМ)	безазотная + L-trp (1мМ)
Kl. planticola 5	2,0 ± 0,05	5,5 ± 0,03	16,2 ± 0,06	45,3 ± 0,08
*Enterobacter sp.*11	–	2,9 ± 0,02	6,1 ± 0,03	19,0 ± 0,06

Для подтверждения способности ассоциативных диазотрофов продуцировать фитогормон в ассоциации с растением провели сравнительное изучение количественного содержания свободной β-ИУК в растениях ячменя [4]. Растения, инокулированные энтеробактериями, накапливали больше ауксина, чем контрольные. Наиболее эффективной оказалась инокуляция растений штаммом *Klebsiella planticola* 5. Максимальное количество β-ИУК в растительном материале фиксировали в фазе кущения: в этот период содержание ауксина в инокулированных растениях превышало контроль в 2,3–2,8 раза. В стадии колошения и созревания содержание β-ИУК в растительном материале снижалось более чем в 2,5 раза. Однако, как и в предыдущей фазе развития, более высокое содержание фитогормона выявили у растений, инокулированных *Kl. planticola* 5. Таким образом, нами показано, что ростстимулирующий эффект исследованных ризобактерий в отношении различных видов сельскохозяйственных растений на ранних стадиях их развития обусловлен синтезом β-ИУК.

Таблица 3. Содержание свободной β-ИУК в растениях ячменя, инокулированных ассоциативными диазотрофами

Вариант опыта	Фазы развития растений		
	кущение	колошение	созревание
Контроль (без инокуляции)	1,7	0,7	0,65
Kl. planticola 5	4,7	1,69	1,42
Enterobacter sp. 11	3,92	1,52	1,32

Литература:

1. *H. Abde-laly, D. Prevost, W. Broughton, A. Hani.* // Effets de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* sur la croissance du ble dans deux sols du Maroc - Can. J. Microbiol., 2001, v. 47, № 6, c. 590-593.
2. Методы общей бактериологии: в 3 т. / Под ред. Ф.Герхардта и др. – М.: Мир, 1983, т. 1, 536 с.
3. *Libbert E.* Isolation and identification of the IAA-producing and degrading Bacteria from Pod Plants // Phisiologis Plantarum, 1969, v. 22, p 51-58.
4. Методы определения фитогормонов, ингибиторов роста, дефолиантов и гербицидов. – М: Наука, 1973. – 199 с.

PRODUCTION OF INDOLYL-3-ACETIC ACID BY RHIZOSPHERIC BACTERIA

Safronova G.V.

Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences, Minsk, Belarus
e-mail: hsafronava@mail.ru

Now it is well known that symbiotic, associative and free living microbial species showing growth-promoting effect produce auxins [1]. That is why we studied ability of diazotrophic and phosphate-mobilizing rhizosphere bacteria stimulating growth of grain, legume, vegetable and cruciferous to synthesize ß-indolyl-3-acetic acid.

Results of phytohormone quantitative analysis showed variation of indole cultures compound content in cultural liquid of rhizobial strains (table 1). Maximal amount of heteroauxin was produced by strains *R. leguminosarum bv. pisum* 3021 and 5114 (32.8 and 40.3 µg ß-IAA/ml). Other strains synthesized 21.3–31.0 3 µg ß-IAA/ml cultural liquid.

Table 1. ß-IAA level in cultural liquid of rhizosphere bacterial strains

R. leguminosarum bv. pisum		Associative diazotrophs		Phosphate-mobilizing bacteria	
		Kl. planticola 5	*Enterobacter sp.* 11	*Streptococcus sp.*35	*Bacillus sp.* 46
Strain №	ß-IAA concentration, µg/ml				
250a (reference strain)	26.0 ± 1.47	45.3 ± 0.08	19.0 ± 0.06	73.3 ± 0.67	20.3 ± 0.83
3021	32.8 ± 0.77				
3733	30.3 ± 0.88				
4703	21.3 ± 0.67				
4544	23.5 ± 0.50				
5114	40.3 ± 2.36				
5424	31.0 ± 0.91				
$LSD_{0,95}$	1.30	1.25			

Auxinogenesis capacity was revealed also in associative diazotrophic and phosphate-mobilizing bacteria. These microorganisms generated 19.0–73.3 µg ß-IAA/ml cultural liquid.

Amount of phytohormone produced by pure cultures of associative rhizobacteria largely depended on composition of nutrient media (table 2). The level of ß-IAA synthesis was 2.8–3.1 times higher on nitrogen-free medium [2] as compared to minimal test medium [3]. Supply of 1 mM thryptophan into cultural medium enhanced production of indole compound 6.6–8.2-fold, whereas top level of auxin formation was recorded for enterobacteria at stationary growth phase – 3 days upon inoculation.

Table 2. ß-IAA production by associative diazotrophs

Experimental variant	Nutrient medium			
	test medium	nitrogen-free medium	test medium + L-trp (1 mM)	nitrogen-free medium +L-trp (1 mM)
Kl. planticola 5	2.0 ± 0.05	5.5 ± 0.03	16.2 ± 0.06	45.3 ± 0.08
*Enterobacter sp.*11	–	2.9 ± 0.02	6.1 ± 0.03	19.0 ± 0.06

To prove ability of associative diazotrophs to produce phytohormone in consortium with plants comparative examination of free ß-IAA content in barley was performed [4]. It was found that plants inoculated with enterobacteria accumulated more auxin than control variants. Inoculation with strain *Klebsiella planticola* 5 demonstrated the peak efficiency. Maximal amount of ß-IAA in vegetative material was registered at tillering phase: auxin content in inoculated plants exceeded control values by 2.3–2.8 times. In the course of earing and maturing phases ß-IAA level fell more than 2.5-fold. Yet, like at tillering stage, elevated phytohormone concentration was detected in plants inoculated with *Kl. planticola* 5. Summing up, we have shown that growth-promoting effect of studied rhizobacteria on diverse cultivars at early development stages is determined by ß-IAA synthesis.

Table 3. Free ß-IAA content in barley plants inoculated with associative diazotrophs

Experimental variant	Plant development phases		
	tillering	earing	maturing
Control (not inoculated)	1.7	0,72	0.65
Kl. planticola 5	4.7	1.69	1.42
Enterobacter sp. 11	3.9	1.52	1.32

References:

1. *H. Abde-laly, D. Prevost, W. Broughton, A. Hani.* // Effets de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* sur la croissance du ble dans deux sols du Maroc - Can. J. Microbiol., 2001, v. 47, № 6, c. 590-593.
2. Methods of general bacteriology in 3 volumes / ed. F. Gerhardt et al, Moscow, Mir Publ., 1983, v. 1, 536p.
3. Libbert E. Isolation and identification of the IAA-producing and degrading Bacteria from Pod Plants // Phisiologis Plantarum, 1969, v. 22, p 51-58.
4. Methods of analyzing phytohormones, growth inhibitors, defoliants and herbicides – Moscow, Nauka Publ., 1973, 199 p.

ПОЛУЧЕНИЯ КОНЪЮГАТА ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО И ТЕРМОЛАБИЛЬНОГО ЭНТЕРОТОКСИНОВ *ESCHERICHIA COLI*

Сухарев Ю.С.

Харьковская государственная зооветеринарная академия, Малая Даниловка, Украина
e-mail:Yuriy_sukharev@mail.ru

Ведущими патогенетическими факторами *Escherichia coli* являются энтеротоксины - термостабильный (ST) и термолабильный (LT). Из двух видов энтеротоксинов только LT обладает иммуногенными свойствами, тогда как ST-является гаптеном, что существенно затрудняет получение специфических антител и идентификацию токсигенных штаммов, продуцирующих этот токсин, в классических иммуно-химических тестах. Антитела к гаптенам представляют значительный интерес в иммунологических, биохимических, фармакологических исследованиях, а также в клинической диагностике. Получение таких антител осложнено тем, что низкомолекулярные вещества, как правило, неиммуногенны и сами по себе не индуцируют антителообразование. Антигенные детерминанты таких веществ состоят из небольшого числа аминокислотных или углеводных остатков.

Было показано, что присоединение к белку посредством химических связей гаптенных групп, или введение в молекулу белка простых химических групп приводит к изменению антигенных свойств белковых молекул. Встроенная группа обеспечивает белку новую специфичность. Конъюгированные антигены индуцируют синтез антител, способных реагировать как с носителем, так и с гаптеном.

Существуют различные способы конъюгации гаптена с белком-носителем. Часто для этой цели применяют диазопроизводные ароматических соединений- толуол-2,4-диизоцианат, 1-этил-1,3(3-диметил аминопропил) карбодиимид или пенициллин, обладающий способностью реагировать in vivo с белками через пенициллоил-лизиновую группу. Однако, эти методы имеют ряд недостатков, в частности длительность получения и низкий выход конъюгатов с большим количеством побочных продуктов.

Весьма удобным химическим линкером является глутаровый альдегид, который взаимодействует с ε-аминогруппами лизиновых остатков белков. К тому же, по мнению ряда авторов, именно глутаральдегид, в сравнении с другими веществами используемыми для конъюгации белков, в большей степени “щадит” иммунологическую активность полимеризуемых молекул.

Механизм реакции глутаральдегида с белками до конца не изучен. Одновременно протекает несколько реакций, приводящих к появлению смеси продуктов, содержащих более прочные химические связи, чем в простых основаниях Шиффа. Однако в общем виде схему реакции можно представить в следующем виде:

1. $\varepsilon\text{-}NH_2+O=CH\ (CH_2)_3CH=O \rightarrow \varepsilon\text{-}N=CH\ (CH_2)_3CH=O$;
2. $\varepsilon\text{-}N=CH\ (CH_2)_3CH=O+NH_2\text{-белок} \rightarrow \varepsilon\text{-}N=CH\ (CH_2)_3CH=N\text{-белок}$

Целью исследований была разработка метода получения конъюгированных энтеротоксинов *E.coli*.

Новизна предлагаемого решения заключалась в получении конъюгата из нативных молекул энтеротоксинов *E.coli*, методом двухступенчатого глутаральдегидного сшивания, где на первой стадии глутаровым альдегидом обрабатывали белок-носитель (LT), удаляли избыток альдегида, а затем уже к модифицированному лиганду добавляли гаптен (ST), что исключало образование ковалентных связей между молекулами гаптена (ST-ST), препятствующих синтезу достаточного количества конъюгата, ускоряло получение и увеличивало специфичность конечного продукта. В этом случае гаптен выступал в роли доминантной иммунодетерминанты и антитела образовывались преимущественно к гаптену.

Конъюгат молекул ST и LT-энтеротоксинов *E.coli*, полученный методом двухступенчатого глутаральдегидного сшивания, индуцировал синтез биспецифических антитоксических антител у иммунизированных животных и обладал высокими иммуногенными свойствами.

Иммунизирующий препарат	ST в конечном конъюгате X±s (%), n=5	Количество иммунизированных конъюгатом мышей выживших после заражения 2Dlm	
		ST	LT
Конъюгат энтеротоксинов	98,25 ± 2,36	96,0 ± 0,08	86,6 ± 0,06

Конъюгат ST/LT-энтеротоксинов планируется использовать в качестве иммунизирующего препарата против токсигенных *E.coli*, а также для получения антитоксических антител и конструирования диагностических тест-систем на их основе.

Литература:

1. *Qadri F., Kumar Das S., G. Faruque A. S., Fuchs G. J., John Albert M., Sack R. B., Svennerholm A.-M.* Prevalence of Toxin Types and Colonization Factors in Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated during a 2-Year Period from Diarrheal Patients in Bangladesh // J. Clin Microbio l- 2000, January; 38(1).-p. 27–31.
2. *Олійник Л.В.* Розповсюдження ешерихій та оцінка їх патогенного потенціалу //Ветеринарна медицина: Міжвідомчий тематичний науковий збірник- Харків, 2004. №83,С.167-170.
3. *Osek J.* Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heatstable enterotoxin 1 (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin markers in *E. coli* isolates from pigs with diarrhea //Vet. Microbiol- 2003,T.91, №1, p. 65–72.
4. *Сухарев Ю.С.* Энтеротоксины *Escherichia coli* (методы получения, очистки, изготовление иммунизирующих препаратов, антитоксических сывороток и диагностических тест-систем на их основе)- Харьков, Коллегиум, 2009,92 с.
5. А.С. СССР, МКИ 5 А 61 К 39/108. (СССР). Синтетическая питательная среда для получения термостабильного энтероксина *Escherichia coli* /Ю.С. Сухарев, Г.В. Гнатенко (СССР).- N4930440/13; заявл. 28.03.91; опубл. 30.07.92, бюл. 28.
6. *Койко Р., Саншайн Д., Бенджамин Э.* Иммунология [Пер. с англ.под ред.Серебряной Н.Б.].-М.:Академия, 2008.-365 с.

RECEIPTS OF CONJUGATE HEAT-STABLE AND HEAT-LABILE ENTEROTOXINS OF *ESCHERICHIA COLI*

Sukharev Yu.S.

Kharkov State Zooveterinary Academy, Mala Danylivka, Ukraine
e-mail:Yuriy_sukharev@mail.ru

The leading nosotropic factors of *Escherichia coli* are enterotoxins – heat-stable (ST) and heat-labile(LT).

From two types of enterotoxins only LT possesses immunogenic properties, while ST by a – is hapten, that hampers the receipt of specific antibodies and authentication of toxigenic strains producting this toxin substantially, in classic immuno-chemical tests.

Antibody to the haptens present considerable interest in immunological, biochemical, pharmacological researches, and also in clinical diagnostics. The receipt of such antibodies is complicated by that low-molecular substances, as a rule, notimmunogenic and formation of antibodies does not induce in itself. Antigen determinat‘s of such substances consist of small number amino acid or carbohydrate bits and pieces.

It was shown that tacking to the albumen by means of chemical connections of hapten groups, or introduction to the molecule of albumen of simple chemical groups causes the change of antigen properties of albuminous molecules. A built-in group provides a squirrel new specificity. Conjugation antigens induce the synthesis of antibodies, able to react both with a carrier and with a hapten.

There are different ways of conjugation of hapten with an albumen-carrier. Often diazoderivatives of aromatic connections apply for this aim - toluol-2,4-diizocianat, 1 - ethyl - 1,3(3-deemethyl amynopropil) carbodiimide or penicillin possessing ability to react in vivo with squirrel through a penicilloil - lysin group. However, these methods have a row of defects, in particular duration of receipt and subzero exit of conjugate with plenty of side foods.

Very comfortable chemical lenker is a glutaraldehyde that co-operates with ε-aminogroup lysin of bits and pieces of albumens. Besides, in opinion of row authors, exactly glutaraldehyde, by comparison to other substances used for conjugation of albumens, in a greater degree "spares" immunological activity of the polymerized molecules.

The mechanism of reaction of glutaraldehyde with squirrel to the end is not studied. A few reactions resulting in appearance of mixture of foods flow at the same time, containing more durable chemical connections, than in the simple grounds of Schiff. However in a general view the chart of reaction can be presented in a next kind:

1. ε- NH2 O=CH (CH2) 3CH=O→ε- N=CH (CH2) 3CH=O;
2. ε- N=CH (CH2) 3CH=O NH2 -белок→ε- N=CH (CH2) 3CH=N- protein

Aim of researches was development of method of receipt of conjugation enterotoxins of *E.coli*. Novelty of the offered solution consisted in the receipt of conjugate from the native molecules of enterotoxins of *E.coli*, by the method of the two-stage glutaraldehyde sewing together, where on the first stage it was processed a glutaraldehyde protein - carrier (LT), deleted surplus of aldehyde, and then already to the modified ligand added the hapten (ST), that eliminated formation of covalently connections between the molecules of hapten (ST - ST) impedimental to the synthesis of sufficient amount of conjugate accelerated a receipt and increased specificity finished good. In this case a hapten played role of dominant immunodetermine and antibody appeared mainly to the hapten.

Conjugate of molecules of ST and LT - enterotoxins *E.coli* got the method of the two-stage glutaraldehyde sewing together induced the synthesis of bispetsific of antitoxic antibodies for the immunized animals and possessed high immunogenic properties.

Immunizing preparation	ST in eventual conjugate X±s (%), n=5	Amount of the immunized conjugate mise survivor after an infection 2Dlm	
		ST	LT
Conjugate of enterotoxins	98,25 ± 2,36	96,0 ± 0,08	86,6 ± 0,06

References:

1. *Qadri F., Kumar Das S., G. Faruque A. S., Fuchs G. J., John Albert M., Sack R. B., Svennerholm A.-M.* Prevalence of Toxin Types and Colonization Factors in Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated during a 2-Year Period from Diarrheal Patients in Bangladesh // J. Clin Microbio l- 2000, January; 38(1).-p. 27–31.
2. *Олійник Л.В.* Розповсюдження ешерихій та оцінка їх патогенного потенціалу //Ветеринарна медицина: Міжвідомчий тематичний науковий збірник- Харків, 2004. №83,С.167-170.
3. *Osek J.* Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heatstable enterotoxin 1 (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin markers in *E. coli* isolates from pigs with diarrhea //Vet. Microbiol- 2003,T.91, №1, p. 65–72.
4. *Сухарев Ю.С.* Энтеротоксины *Escherichia coli* (методы получения, очистки, изготовление иммунизирующих препаратов, антитоксических сывороток и диагностических тест-систем на их основе)- Харьков, Коллегиум, 2009,92 с.
5. А.С. СССР, МКИ 5 А 61 К 39/108. (СССР). Синтетическая питательная среда для получения термостабильного энтероксина *Escherichia coli* /Ю.С. Сухарев, Г.В. Гнатенко (СССР).- N4930440/13; заявл. 28.03.91; опубл. 30.07.92, бюл. 28.
6. *Койко Р., Саншайн Д., Бенджамин Э.* Иммунология [Пер. с англ.под ред.Серебряной Н.Б.].-М.:Академия, 2008.-365 с.

КОРРЕКЦИЯ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКА И ЕГО ФРАКЦИЙ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ТЕЛОК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМ КОМПЛЕКСОМ ИЗ КУКОЛОК ШЕЛКОПРЯДА

Трокоз В.А.

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины (НУБиП), Киев, Украина,
e-mail: tassar@bigmir.net

В последнее время обращается внимание на значительное количество синтезированных лечебно-профилактических препаратов и кормовых добавок, способных вызывать нежелательные последствия, особенно при неконтролированном использовании. В связи с этим, важное значение приобретает производство указанных веществ из натурального сырья. В НУБиП выведена моновольтинная порода дубового шелкопряда Полесский тасар. Из тканей этого насекомого получен ряд высокоценных биологически активных веществ, которые могут применяться, в частности, и в животноводстве. Цель работы – изучение содержания общего белка и соотношения его фракций в сыворотке крови телок во время влияния биологического раздражителя при превентивной обработке животных гидрофильным экстрактом из куколок шелкопряда (ГЭ). Опыты проводили в ООО “Гейсиское” Ставищенского р-на, Киевской обл. на двух группах телок-аналогов украинской черно-пестрой молочной породы 6–7 месячного возраста, массой 130–165 кг, по 8 голов в каждой. Телки 2-й опытной группы с интервалом 5 суток получали 2 подкожных инъекции ГЭ (0,1 мл на 1 кг массы тела). Животным 1-й контрольной группы в это время вводили такие же дозы изотонического раствора NaCl. Через 10 суток после последней обработки ГЭ животных обеих групп вакцинировали против сальмонеллеза. Отбор проб крови для анализов проводили в начале исследования (№1), через 10 суток после первого введения экстракта (№2), через 10 (№3), 20 (№4), 30 (№5), 45 (№6) и 65 (№7) суток после первой вакцинации. Результаты обработки животных ГЭ оценивали по показателям содержания общего белка (биуретовая реакция) и соотношения его фракций в сыворотке крови (турбидиметрическим-нефелометрическим методом).

Установлено, что на изученные показатели в той или иной степени влияли как биологический раздражитель (вакцинация), так и комплекс биологически активных веществ ГЭ. Динамика содержания общего белка характеризовалась у животных обеих групп постепенным повышением после вакцинации с последующим снижением к окончанию эксперимента. У животных, получавших превентивные инъекции ГЭ, содержание общего белка достоверно превышало начальный показатель (№1) через 10 суток после обработки (№2). В это же время подопытные телки имели на 5% больше ($p \leq 0,01$) общего белка, чем их контрольные аналоги, достоверная разница с которыми отмечена и в исследовании №4. Во все другие сроки эксперимента наблюдали, хотя и близкую к пределу достоверности, лишь тенденцию к превышению опыта над контролем. Относительно разницы с фоновыми показателями, то у животных 2-й группы отмечено достоверное повышение содержания белка в исследованиях №3–6, после чего этот параметр стал снижаться. У представителей 1-й группы таких изменений не наблюдали.

Интересными с научно-практической точки зрения оказались и результаты исследования белкового спектра сыворотки крови. Установлено, что вакцинация животных против сальмонеллеза вызывала постепенное достоверное снижение содержания альбуминов и повышение содержания глобулинов с последующим постепенным возвращением к фоновым значениям. Отметим, что такие изменения как в абсолютных, так и в относительных величинах дольше длились у контрольных животных, что свидетельствует об увеличении адаптационных возможностей организма животных под воздействием ГЭ. Необходимо отметить, что относительное содержимое глобулинов в сыворотке крови животных 2-й группы было достоверно выше, чем у телок контроля в исследованиях №2–4. При этом абсолютное содержание глобулинов относительно контроля почти не изменилось, что подтверждает рост содержания белка сыворотки крови под воздействием ГЭ. Касательно глобулиновой фракции следует отметить, что наиболее реактивными оказались гамма-глобулины. На влияние биологического раздражителя они реагировали увеличением как относительного, так и абсолютного содержания к исследованию №4 с последующим постепенным снижением. Достоверной разницы по содержанию гамма-глобулинов между представителями обеих групп не установлено, хотя существует тенденция к повышению содержания этой фракции под воздействием ГЭ. Очевидно, такая картина объясняется более значительным раздражающим влиянием на этот показатель проведенной вакцинации. При рассмотрении динамики альфа- и бета-глобулинов под воздействием вакцинации и экстракта из куколок шелкопряда особенных тенденций не установлено за исключением снижения абсолютного содержания альфа-глобулинов у животных опытной группы сразу после введения экстракта в сравнении с фоновым показателем. Установлено также повышение относительно фона содержания бета-глобулинов у контрольных телок в исследовании №6. Это может быть обусловлено перераспределением адаптационно-компенсаторных механизмов у животных в результате образования поствакцинального иммунитета.

Таким образом, влияние ГЭ на систему белков сыворотки крови при действии биологических раздражителей заключается в активации белоксинтетических процессов, что обосновано достоверным ростом содержания общего белка сыворотки крови. Вместе с тем, концентрация и относительное содержимое белковых фракций под воздействием ГЭ изменились мало. Это касается, в частности, и глобулинов, принимающих участие в специфической защите организма. Очевидно, биологически активные вещества экстракта активируют механизмы неспецифического иммунитета. Это свидетельствует о возможности создания на основе гидрофильных комплексов биологически активных веществ из куколок шелкопряда новых адаптогенных препаратов лечебно-профилактического действия.

THE BLOOD SERUM PROTEIN AND ITS FRACTIONS CONTENT IN HEIFERS BY SILKWORM CHRISALISES BIOLOGICALLY ACTIVE COMPLEX CORRECTION

Trokoz V. A.

National university of live and environmental science of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: tassar@bigmir.net

Recently the attention to a significant amount of the synthesized treatment-and-prophylactic preparations and the fodder additives, capable to cause undesirable consequences is paid, especially at not supervised use. In this connection, the great value gets manufacture of the specified substances from natural raw materials. In National University of live and environmental science of Ukraine breed of oak silkworm monovoltine breeds Tassar of Polissya. From tissues of this insect a series highly valuables biologically active substances which with success can be applied, in particular, and in animal industries is received. The work purpose – of the content of the general protein and a parity its fractions in serum blood heifers during biological irritant influence at preventive processing of animals by hydrophilic extract from silkworm chrysalises (HE) studying. Experiences spent to Open Company "Geisyske" (Stavishche district, Kiev region) on two groups of Ukrainian black-motley milk breed heifers-analogs (6–7 monthly age, mass 130–165 kg), on 8 beasts in everyone. Heifers 2nd skilled group with an interval of 5 days 2 hypodermic injections HE received (0,1 ml on 1 kg of mass of a body). An animal of 1st control group at this time the same doses of isotonic solution NaCl entered. In 10 days after last processing HE of animal both groups vaccinated against a salmonellosis. Sampling of a blood for analyses conducted in the beginning of research (№1), in 10 days after the first introduction of an extract (№2), in 10 (№3), 20 (№4), 30 (№5), 45 (№6) and 65 (№7) days after the first vaccination. Results of HE processing of animals on indicators of the general protein content (biuret reaction) and its fractions parities in blood serum (turbidimetric-nephelometric method) estimated.

It is established that the studied indicators to some extent influenced both a biological stimulus (vaccination), and a complex of HE biologically active substances. Dynamics of the general protein content was characterized at animal both groups by gradual rising after vaccination with the subsequent depression to the experiment termination. At the animals receiving preventive injections HE, the content of the general protein authentically exceeded an initial indicator (№1) in 10 days after processing (№2). During the same time experimental heifers had on 5 % more ($p \leq 0,01$) the general protein, than their control analogs the authentic difference with which isn't and in research №4. In all other terms of experiment observed, though also close to a reliability limit, only a tendency to excess of experience over control. Concerning a difference with background indicators at animals of 2nd group authentic rising of the protein content in researches №3–6 then this parameter began to decrease isn't. At representatives of 1st group of such changes didn't observe.

Interesting from the scientifically-practical point of view there were also results of research of blood serum albuminous spectrum. It is established that vaccination of animals against a salmonellosis caused gradual authentic depression of the content of albumins and rising of the globulins content with the subsequent gradual homing to background value. We will notice that such changes both in absolute, and in relative sizes lasted at control animals that testifies to augmentation of animals organism adaptic possibilities under the HE longly influence. It is necessary to notice that relative contents of globulins in blood serum of animals of 2nd group were authentically above, than at heifers control in researches №2–4. Thus the absolute globulins content concerning control hasn't changed almost that confirms growth of the serum protein content under the HE influence. Concerning globulins it is necessary to notice fractions that gamma-globulins have appeared the most reactive. They reacted to influence of a biological stimulus augmentation both relative, and the absolute content to research №4 with the subsequent gradual depression. An authentic difference under the gamma-globulins content between representatives of both groups it is not established, though there is a tendency to rising of the this fraction content under the HE influence. Obviously, such picture speaks more appreciable irritating influence on this indicator of the spent vaccination. By treating of dynamics an alpha- and beta globulins under the vaccination influence and silkworm chrysalises extract of especial tendencies it is not established except for depression of the absolute alpha globulins content at skilled group animal's right after extract introduction in comparison with a background indicator. Rising concerning a background of the beta globulins content at control heifers in research №6 is established also. It can be caused redistribution of animals adaptic and compensatory mechanisms as postvaccinal immunity formation result.

Thus, influence HE on serum proteins system at action of biological irritant consists in albumen synthesis processes activating that is proved by authentic growth of the general serum protein content. At the same time, concentration and relative albuminous fractions contents under the HE influence have changed a little. It concerns, in particular, and the globulins which are taking part in specific protection of an organism. Obviously, extract biologically active substances nonspecific immunity mechanisms activate. To possibility of creation on the basis of hydrophilic complexes of biologically active substances from silkworm chrysalises new adaptogenic treatment-and-prophylactic action preparations it testifies.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИКОРНОГО ЗОЛЯ ОСЕТРОВЫХ РЫБ В КАЧЕСТВЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ ОСНОВЫ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД

Харенко Е.Н., Дмитриева Е.А., Цвылев О.П., Сытова М.В.

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

В настоящее время известны питательные основы для большинства микробиологических сред, являющиеся белковыми гидролизатами, содержащие комплекс веществ, необходимых для нормального роста и размножения микробной популяции. В рыбной отрасли используются рыбные бульоны, белковые гидролизаты из рыбной муки, путассу, креветки, сайки. Недостатками этих питательных сред являются трудоемкость технологического процесса, его длительность и большое количество операций. Поэтому является актуальной проблема использования вторичного сырья, упрощения процесса производства основы для микробиологических сред и сокращения его длительности.

Для решения данной проблемы нами было предложено использование нетрадиционного вторичного сырья прижизненного получения икры V стадии зрелости у осетровых рыб - овариальной жидкости, которая накапливается в значительном количестве в брюшной полости самки к началу овуляции ооцитов (икринок). По нашим данным ее образуется от 10 до 40% от массы икры-сырца, или 5 до 10% от массы рыбы. Она представляет собой коллоидный раствор от полупрозрачного до мутного; от светло-бежевого до слегка сероватого и розового. В связи с высоким содержанием в коллоиде макро-и микроэлементов нами предложено товарное название – «Икорный золь» (ИЗ).

Результаты исследований показали, что в икорном золе осетровых рыб содержатся все необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов компоненты, такие как: белок, аминокислоты, макроэлементы (натрий, фосфор, калий, кальций, магний) и микроэлементы (железо, медь, марганец, цинк), водорастворимые витамины (витамин С и витамины группы В), что обусловило возможность применения икорного золя как питательной среды для микробиологии.

Помимо присутствия необходимых питательных веществ важным условием хорошего роста микроорганизмов является оптимальная концентрация водородных и гидроксильных ионов. В икорном золе этот показатель имеет значения pH 7,4-8,5, которые обеспечивают интенсивный рост практически всех микроорганизмов. Нормальное протекание важнейших физико-химических процессов в микробных клетках обеспечивается изотоничностью для них питательной среды, соответствующей 0,5% (5‰) раствору натрия хлорида. По этому показателю икорный золь также пригоден для использования в качестве питательной среды.

Получение питательной основы для микробиологических сред предусматривает следующие этапы: отбор икорного золя осетровых рыб V стадии зрелости, его фильтрацию с последующей гомогенизацией, высушивание на распылительной сушке и последующее разведение до необходимой концентрации.

В качестве тест-объекта использовали инфузории Stylonichia mytilus, питательным субстратом для которых служит суспензия пекарских дрожжей, которая используется в качестве эталонной среды. Она, как известно, содержит весь необходимый комплекс биологически важных соединений и элементов. Как показали сравнительные испытания, икорный золь по биологической активности существенно превосходит эталонную среду. Эксперимент показал, что значение относительного прироста численности инфузорий за сутки в растворе ИЗ (в концентрации 0,4 г сухого вещества/л) составляет 5,0 и превышает таковой в эталонной среде (2,5) в 2 раза. Из этого следует, что икорный золь имеет высокую биологическую ценность и может служить питательной основой для выращивания большого спектра микроорганизмов. Однако данная питательная основа не является дифференциально-диагностической или селективной средой.

Разработанный способ позволит расширить сырьевую базу, наряду с традиционным рыбным сырьем, использовать вторичное сырье при получении микробиологических сред для культивирования различных видов микроорганизмов, существенно упростить процесс производства основы питательных сред и сократить его длительность.

Получен патент на изобретение №2391392 РФ, МПК C12N 1/20 «Способ получения питательной основы для микробиологических сред» 2008142446/13(055177).

THE USE OF STURGEONS' ROE ZOL AS THE NUTRITIOUS BASIS FOR MICROBIOLOGICAL MEDIUMS

Kharenko E.N., Dmitrieva E.A., Tsvylev O.P., Sytova M.V.

VNIRO, Moscow, Russia
e-mail: harenko@vniro.ru

Now nutritious bases for the majority of the microbiological mediums, being the protein hydrolysates, containing a complex of the substances necessary for normal growth and reproduction of microbic population are known. In fish industry fish broths, protein hydrolysates from a fish meal, whiting, shrimp, Arctic cod are used. The disadvantages of these substratums are labor input of technological process, its duration and the large number of operations. It is therefore urgent problem of using of secondary raw materials, simplifying the process of production basis for microbiological agents and reduction of its duration.

To resolve this problem, we proposed the use of nontraditional secondary raw materials taken from live parent stock of ovulated eggs V maturity stage of the sturgeons - ovarian fluid that accumulates in considerable quantities in the abdominal cavity of a female to the beginning of an ovulation of oocytes (eggs). According to our data it is formed from 10 to 40% by weight of raw eggs, or 5 to 10% by weight of the fish. It represents a colloidal solution from translucent to the muddy; from light-beige to slightly grayish and pink. Due to the high content in the colloid of macro-and micronutrients we proposed commodity name - "Roe zol"(RZ).

The results of researches have shown that sturgeons' RZ contains all the necessary components for ability to live of microorganisms, such as: protein, amino acids, macroelements (sodium, phosphorus, potassium, calcium, magnesium) and micronutrients (iron, copper, manganese, zinc), water-soluble vitamins (vitamin C and group B vitamins) that has caused possibility of using RZ as a substratum for microbiology.

Besides presence of necessary nutrients by an important condition of good growth of microorganisms optimum concentration of hydrogen and hydroxyl ions is. In RZ this indicator has a pH value 7,4-8,5, which provide intensive growth of almost all microorganisms. Normal course of the major physical and chemical processes in microbic cells is provided for them an isotonic substratum corresponding of 0,5 % (5 ‰) to a solution of sodium of chloride. According to this indicator RZ is also suitable for use as a substratum for microbiology.

Getting nutritious basis for microbiological mediums includes the following steps: selection of sturgeons' RZ of V maturity stage, its filtration with the subsequent homogenization, drying in spray drying and the subsequent dilution to necessary concentration.

As a test object used infusorians Stylonichia mytilus, as a nutritious substrate for which is suspension of baker's yeast which is used as the reference medium. It, as it is known, contains all necessary complex of biologically important compounds and elements. As have shown comparative tests, RZ in biological activity essentially surpasses the reference medium. The experiment has shown that value of a relative gain of number of infusorians for day in RZ solution (in concentration 0,4 г dry substance/l) makes 5,0 and exceeds that in reference medium (2,5) in 2 times. It follows from this that RZ has high biological value and can form a nutritious basis for cultivation of the big spectrum of microorganisms. However, the given nutritious basis isn't a differential-diagnostic or selective medium.

The developed method will allow to expand a raw-material base, together with the traditional raw fish, to use secondary raw materials in obtaining microbiological mediums for the cultivation of various species of microorganisms, to simplify greatly the process of production bases of nutrient mediums and to reduce its duration.

The patent for the invention № 2391392 Russian Federations, by MPK C12N 1/20 «the Way of obtaining of a nutritious basis for microbiological mediums" 2008142446/13 (055177) is received.

СКРИНИНГ ПРОДУЦЕНТОВ ПРОТЕИНАЗЫ СРЕДИ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Черная А.Н., Черкасова Л.В., Костеневич А.А., Сапунова Л.И.

Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: leonida@mbio.bas-net.by

Протеолитические ферменты относятся к классу гидролаз (КФ 3.4.4) и катализируют гидролиз пептидных связей белков до аминокислот, ди- и полипептидов. Они выполняют ключевую роль в функционировании микробной клетки, процессах ее роста и морфогенеза, активации зимогенов, транспорте секреторных белков и пептидов, развитии патологических процессов и их преодолении. Внеклеточные протеиназы микроорганизмов катализируют, главным образом, гидролиз крупных белковых молекул до небольших пептидных остатков, которые затем используются как источник азотного питания, внутриклеточные – регулируют клеточный метаболизм. Кроме того, неоценима их роль в современном производстве продуктов питания, кормов, препаратов медицинского и ветеринарного назначения, диагностических реагентов, текстиля, кожи, моющих средств и др. [1-4]. Продуцентами коммерчески востребованных протеиназ являются микроорганизмы и, частности, бактерии рода *Bacillus*. Около половины мирового рынка протеолитических ферментных препаратов составляют продукты, полученные с использованием этой группы микроорганизмов [5].

Целью проведенных исследований явился поиск среди представителей бактерий рода *Bacillus* штаммов, продуцирующих протеиназы.

В работе использовали 60 культур микроорганизмов, представленных различными штаммами 12 видов бактерий рода *Bacillus* из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. Скрининг штаммов, проявляющих протеолитическую активность, осуществляли чашечным методом на агаризованных средах, содержащих сухое молоко (5%) или молочную сыворотку (2,5%) в качестве комплексных источников углеводного и азотного питания. Выращивание бактерий проводили при температуре 27-29^{0}С в течение 24-72 ч. О протеолитической активности свидетельствовали зоны просветления, образующиеся вокруг колоний микробных культур в результате ферментативного гидролиза казеина молока или молочной сыворотки.

Установлено, что штаммы БИМ В-109 *B. subtilis,* БИМ Б-370 *B. firmus* и БИМ В-181 *B.* s*phaericus* не росли на средах с обоими исследуемыми субстратами. Из выросших на среде с сухими молоком отрицательными по признаку синтеза протеиназы оказались 23%, с молочной сывороткой – 13% от общего количества исследованных бактериальных культур. В число первых вошли *B. cereus* (1 штамм), *B. lentus* (1), *B megaterium* (1), *B. mycoides* (1), *B. subtilis* (3), *B.* s*phaericus* (4), *Bacillus.* spp. (2), в число последних – *B. cereus* (1 штамм), *B. lentus* (1 штамм), *B.* s*phaericus* (3), *Bacillus* spp. (2).

Показано, что доля культур, продуцирующих протеолитические ферменты хотя бы на одной из исследуемых сред, составляла 73%. Обращает на себя внимание также то, что на средах с молочной сывороткой было обнаружено существенно большее, чем на средах с молоком, количество культур с обширными зонами ферментативного гидролиза субстрата. Так, к группе представителей рода *Bacillus,* обладающих потенциально высокой протеиназной активностью на среде с молочной сывороткой, отнесен 41 штамм (70% от общего числа), на среде с сухим молоком – 20 (33%).

Таким образом, в результате выполненных исследований среди 60 культур 12 видов бактерий рода *Bacillus* выявлены штаммы *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus, B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* и *B. subtilis*, которые в качестве источников углерода и азота утилизируют соответственно лактозу и казеин молока или молочной сыворотки и активно продуцируют при этом протеиназы. Сравнительная характеристика продуктивности отобранных штаммов в условиях глубинного выращивания и исследование свойств синтезируемых ими ферментных белков позволит отобрать потенциальный продуцент протеолитических ферментов.

Литература:

1. *K.-H. Maurer* // Detergent proteases – Current Opinion in Biotechnology, 2004, v. 15, p. 330-334.
2. *C. Arunachalam, K. Saritha* // Protease enzyme: an eco-friendly alternative for leather industry – Indian J. Sci. Technol., 2009, v. 2, N 12, p. 29-32.
3. *K. Savijoki, H. Ingmer, P. Varmanen* // Proteolytic systems of lactic acid bacteria – Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, v. 71, p. 394-406.
4. *G.N. Rudenskaya, D.V. Pupov* // Cystein proteases of microorganisms and viruses – Biochemistry (Moscow), 2008, v. 73, N 1, p. 1-13.
5. *R. Gupta, Q.K. Beg, P. Lorenz* // Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial application // Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, v. 59, p. 15-32.

SCREENING OF PROTEASE PRODUCERS AMONG BACTERIA OF GENUS *BACILLUS*

Chernaya A.M., Cherkasova L.V., Kastsianevich A.A., Sapunova L.I.

Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences, Minsk, Belarus
e-mail: leonida@mbio.bas-net.by

Proteolytic enzymes referred to hydrolases (E.C. 3.4.4) catalyze hydrolysis of peptide bonds in proteins to amino acids, di- and polypeptides. They play a key role in microbial cell functions, growth and morphogenesis, activation of zymogens, transport of secretory proteins and peptides, progress of pathological processes and their control. Extracellular microbial proteinases mainly catalyze hydrolysis of large protein molecules to small peptide residues further used as sources of nitrogen nutrition, while intracellular enzymes regulate cell metabolism. In addition, role of proteolytic enzymes in modern food processing technologies, production of fodder, medicines, veterinary drugs, diagnostic reagents, textile, leather, detergents is invaluable [1-4]. Microorganisms, namely bacteria of genus *Bacillus* are sources of commercial proteinases. Half of the global market of proteolytic enzymes is occupied by products derived from this microbial group [5].

Aim of performed investigation is search of protease producers among bacteria belonging to genus *Bacillus*.

60 microbial cultures representing 12 bacterial species of genus *Bacillus* from Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms were used for experiments. Screening of strains displaying proteolytic activity was carried out by plating on agar media containing dried milk (5%) or whey (2.5%) as complex sources of carbon and nitrogen nutrition. Growth of bacteria was performed at temperature 27-29^{0}C during 24-72 h. Proteolytic activity was indicated by clarification zones formed around colonies of microbial cultures after enzymatic hydrolysis of milk or whey casein.

It was found that strains BIM B-109 *B. subtilis,* BIM Б-370 *B. firmus* and BIM B-181 *B.* s*phaericus* did not grow on media with both tested substrates. 23% of cultures growing on media with dried milk did not synthesize proteinase, whereas on whey media 13% of tested bacterial strains did not generate protease. The first list comprised *B. cereus* (1 strain)*, B. lentus* (1), *B megaterium* (1), *B. mycoides* (1), *B. subtilis* (3)*, B.* s*phaericus* (4)*, Bacillus.* spp. (2), the second list included *B. cereus* (1 strain), *B. lentus* (1), *B.* s*phaericus* (3)*, Bacillus* spp. (2).

It was demonstrated that percentage of cultures producing proteolytic enzymes at least on one of the tested media equaled 73%. It should be emphasized that significantly higher number of cultures with vast zones of substrate enzymatic hydrolysis was recorded on whey media as compared to milk media. Among representatives of genus *Bacillus* 41 strains (70% of total number) were qualified as potentially active proteinase producers on media with whey and 20 strains (33% of the total) showed elevated protease activity on media with dried milk.

Summing up, performed studies allowed to reveal among 60 cultures representing 12 species of *Bacillus* bacteria strains *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus, B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* and *B. subtilis* utilizing lactose and casein of milk and whey as carbon and nitrogen sources, respectively, and actively producing proteinases. Comparative examination of productivity of selected strains in submerged culture and characterization of synthesized enzyme proteins will enable to choose a promising producer of proteolytic enzymes.

References:

1. *K.-H. Maurer* // Detergent proteases – Current Opinion in Biotechnology, 2004, v. 15, p. 330-334.
2. *C. Arunachalam, K. Saritha* // Protease enzyme: an eco-friendly alternative for leather industry – Indian J. Sci. Technol., 2009, v. 2, N 12, p. 29-32.
3. *K. Savijoki, H. Ingmer, P. Varmanen* // Proteolytic systems of lactic acid bacteria – Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, v. 71, p. 394-406.
4. *G.N. Rudenskaya, D.V. Pupov* // Cystein proteases of microorganisms and viruses – Biochemistry (Moscow), 2008, v. 73, N 1, p. 1-13.
5. *R. Gupta, Q.K. Beg, P. Lorenz* // Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial application // Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, v. 59, p. 15-32.

TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM L. – ПРОДУЦЕНТ ДИОСЦИНА И ПРОТОДИОСЦИНА В КУЛЬТУРЕ НА СЕВЕРЕ

Шадрин Д.М., Володина С.О., Володин В.В.

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

Спиростаноловый гликозид диосцин и его фуростаноловый аналог протодиосцин относятся к классу стероидных гликозидов и являются производными диосгенина, широко востребованного в фармацевтической промышленности в качестве полупродукта для синтеза кортикостероидов и получения гормональных лекарственных препаратов. В бывшем СССР были разработаны препараты полиспонин, представляющий собой сухой экстракт из корневищ и корней диоскореи ниппонской (*Dioscorea nipponica* Makino) и трибуспонин, получаемый из травы якорцев стелющихся (*Tribulus terrestris* L.) содержащие сумму стероидных гликозидов и обладающие гипохолестеринемической, гемореологической и адаптагенной активностью (Мулевич, 1977, Кемертелидзе, 1982). В 80-х годах в ВИЛР был разработан антисклеротический препарат из семян пажитника сенного (*Trigonella foenum-graecum* L.) – пасенин, однако ввиду отсутствия сырьевой базы он не был зарегистрирован (Фармакогнозия, 2010). За рубежом на основе семян пажитника сенного выпускаются препараты Fenumax - антидиабетического и Sterofen - гипохолестеринемического действия (http://fenugreek.net). Естественным местообитанием пажитника сенного является восточная часть Средиземноморья. Известно, что он может успешно культивироваться в Московской и Новомибирской областях (Израильсон, 1981).

Имеющиеся сведения по локализации биосинтеза стероидных гликозидов в растениях указывают на то, что они синтезируются в листьях в виде фуростаноловых производных, а при транспорте в подземные органы трансформируются в спиростаноловые аналоги.

В работе изучена динамика содержания стероидных гликозидов спиростанолового (диосцин) и фуростанолового (протодиосцин) ряда в растении пажитника сенного по органам в разные фазы его развития при интродукции в Республике Коми (тал. 1 и 2).

Таблица 1. Динамика содержания диосцина в растении *Trigonella foenum-graecum* L.

Части растения / Фазы развития	Листья	Стебли	Корни	Семена
Бутонизация	0,53±0,05	0,42±0,07	0,690±0,090	-
Начало цветения	0,51±0,05	0,44±0,05	0,100±0,026*	-
Цветение	1,27±0,10*	0,65±0,08**	0,032±0,005*	-
Плодоношение	0,15±0,02*	0,14±0,02*	0,330±0,060*	1,12±0,08

Примечание: * - разница с предыдущей фазой по содержанию диосцина достоверна при P<0.001
**- разница с предыдущей фазой по содержанию диосцина достоверна при P<0.05

Таблица 2. Динамика содержания протодиосцина в растении *Trigonella foenum-graecum* L.

Части растения / Фазы развития	Листья	Стебли	Корни	Семена
Бутонизация	1,65±0,18	0,020±0,003	0,014±0,003	-
Начало цветения	0,40±0,04*	0,080±0,014*	0,0040±0,0001*	-
Цветение	0,76±0,06**	0,073±0,008	0,051±0,006*	-
Плодоношение	0,85±0,08	0,050±0,002**	0,08±0,01**	1,96±0,14

Примечание: * - разница с предыдущей фазой по содержанию протодиосцина достоверна при P<0.001
**- разница с предыдущей фазой по содержанию протодиосцина достоверна при P<0.05

Показано, что за вегетационный период пажитник сенной проходит все стадии развития и образует полноценные жизнеспособные семена с высоким содержанием стероидных гликозидов спиростанолового (диосцин) и фуростанолового (протодиосцин) ряда. Установлено, что наибольшее количество диосцина и протодиосцина содержится в семенах, проростках, и листьях. При этом наибольшее количество протодиосцина наблюдается в листьях в фазе бутонизации, а диосцина - в листьях в фазе массового цветения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Отделения биологических наук РАН (проект № 09-Т-4-1002).

Литература:

1. *Кемертелидзе Э.П., Пхеидзе Т.А., Качухашвили Т.Н., Умикашвили Р.С., Турова А.Д., Соколова Л.Н.* Новый антисклеротический препарат трибуспонин. // Хим. Фарм. журн. 1982. №1. С. 119-122.
2. *Мулевич В.М., Богачева Н.П.* Экономическое обоснование использования пажитника сенного в качестве сырья для производства стероидных препаратов. // Хим. Фарм. журн.1977. Т. 5. №2. С. 138-140.
3. Фармакогнозия. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения: учебное пособие / под ред. Г.П. Яковлева. 2-е изд. испр. и доп. СПб.: СпецЛит. 2010. 863 с.
4. *Израильсон В.Ф., Киселев В.П.* К интродукции пажитника сенного в Новосибирской области. // Ресурсы и интродукция полезных растений Сибири. Новосибирск. «Наука». 1981. С. 23-29.
5. http://fenugreek.net

TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM L. – PRODUCER OF DIOSCIN AND PROTODIOSCIN, IN THE CONDITION OF THE INTRIDUCTION IN THE NORTH

Shadrin D.V., Volodina S.O., Volodin V.V.

[1]Institute of Biology, Komi Sci Centre, Ural Branch, Russian Academy of Science, Syktyvkar, Russia

Spirostanol glycoside dioscin and its furostanol analog protodioscin belong to the class of steroidal glycosides. They both are derivatives of diosgenin. Diosgenin is wide asked-for substance in pharmaceutical industry as a semi-product for synthesis of corticosteroids as a base of hormonal medical preparations. In the former USSR preparations Polisponin and Tribusponin have been developed. Polisponin represents a dry extract obtained from rhizomes and roots of *Dioscorea nipponica* Makino. Tribusponin is obtained from the grass of *Tribulus terrestris* L. Both preparations contain the sum of steroidal glycosides and possess hypocholesterolaemic, haemorheological and adaptogenic activitis [3,2]. In the 80-s the antisclerous preparation Pasenin obtained from the seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. has been developed, however it has not been officially registered in the former USSR because of the absence of a raw material for its production [4]. Fenumax, antidiabetic remedy and Sterofen, hypocholesterolaemic remedy obtained from the seeds of *T. foenum-graecum* are issued abroad [5]. The Eastern part of the Mediterranean is an area of the distribution of *T. foenum-graecum*. However *T. foenum-graecum* is successfully cultivated in Moscow and Novosibirsk regions of Russian Federation [1].

Concerning biosynthesis of steroidal in plants it is known that they are synthesized in the leaves in the furostanol form and when transporting to the underground part they are transformed to a spirostanol form.

In this work the dynamics of the content of dioscin and of protodioscin in plant *T. foenum-graecum* in different developmental phases in the conditions of the introduction in Republic of Komi is studied (Tabl. 1 and 2).

Table 1. Dynamics of dioscin content in plant *Trigonella foenum-graecum* L.

Organs of plant / Phase of ontogeny	Leaf	Stem	Root	Seed
Budding	0,53±0,05	0,42±0,07	0,690±0,090	-
Floral initiation	0,51±0,05	0,44±0,05	0,100±0,026*	-
Flowering	1,27±0,10*	0,65±0,08**	0,032±0,005*	-
Fructification	0,15±0,02*	0,14±0,02*	0,330±0,060*	1,12±0,08

Note: * - difference in dioscin content between current phase and previous phase is reliable at P<0.001
**- difference in dioscin content between current phase and previous phase is reliable at P<0.05

Table 2. Динамика Dynamics of protodioscin content in plant *Trigonella foenum-graecum* L.

Organs of plant / Phase of ontogeny	Leaf	Stem	Root	Seed
Budding	1,65±0,18	0,020±0,003	0,014±0,003	-
Floral initiation	0,40±0,04*	0,080±0,014*	0,0040±0,0001*	-
Flowering	0,76±0,06**	0,073±0,008	0,051±0,006*	-
Fructification	0,85±0,08	0,050±0,002**	0,08±0,01**	1,96±0,14

Note: * - difference in protodioscin content between current phase and previous phase is reliable at P<0.001
**- difference in protodioscin content between current phase and previous phase is reliable at P<0.05

It is shown that during vegetation period *T. foenum-graecum* passes all phases of the development and it forms viable seeds with high content of dioscin and protodioscin. It is established that the maximum quantity of dioscin and protodioscin is accumulated in sprouts, leaves and seeds. In leaves the greatest quantity of dioscin was observed in the budding phase. Maximal quantity of protodioscin was observed in the flowering phase.

This work is executed with financial support of the Program of the Division of Biological Sciences of the Russian Academy of Sciences (project № 09-T-4-1002).

Reference:

1. *Izrailson V. F, Kiselev V.P.* Concerning the introduction of fenugreek hay in the Novosibirsk region // Resources and an introduction of useful plants of Siberia. Novosibirsk: "Science", 1981. P. 23-29. (Rus)
2. *Kemertelidze E.P., Pheidze T.A., Kachuhashvili T.N., Umikashvili R. S, Turova A.D., Sokolov L.N.* A new antisclerous preparation tribusponin // Chemical and Pharmaceutical Journal. 1982. N 1. P. 119-122. (Rus).
3. *Mulevich V. M, Bogachyov N.P.*economic justification of use fenugreek hay as raw materials for manufacture of steroid preparations // Chemical and Pharmaceutical Journal.1977. T. 5. N 2. P. 138-140. (Rus.)
4. Pharmacognosy. Medicinal raw materials of a vegetative and animal origin: the manual / Ed. G.P.Jakovlev. Second edition. SPb, 2010. 863 p (Rus).
5. http://fenugreek.net

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *XYLA* БАКТЕРИЙ РОДА *ARTHROBACTER* РЕКОМБИНАНТНЫМИ ШТАММАМИ *ESCHERICHIA COLI*

[1]Шляхотко Е.А., [1]Сапунова Л.И., [2]Евтушенков А.Н.

[1]Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси,Минск, Беларусь
e-mail: ekaterina_shl@mail.ru
[2]Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Ксилозоизомераза (D-ксилоза кетолизомераза, КФ 5.3.1.5) – фермент нестрогой субстратной специфичности, катализирующий изомеризацию широкого спектра альдосахаров в кетоформы, в том числе D-ксилозу в D-ксилулозу и D-глюкозу в D-фруктозу. Ксилозоизомераза применяется в промышленности при производстве глюкозо-фруктозных сиропов и кристаллической фруктозы – натуральных подсластителей из возобновляемого крахмалсодержащего сырья. Основными продуцентами фермента, различающегося субстратной специфичностью, в том числе сродством к глюкозе, термо- и pH-оптимумами, удельной активностью, являются микроорганизмы родов *Streptomyces, Arthrobacter* [1, 2]. В настоящее время для повышения продуктивности производственных штаммов наряду с традиционными методами селекции все более широко используются технологии рекомбинантных ДНК, предусматривающие выделение генов, кодирующих ферменты с оптимальными для промышленных процессов свойствами, и их клонирование под контролем сильного промотора в выбранном микроорганизме-хозяине [1].

Целью настоящей работы явилось выделение и клонирование в *Escherichia coli* генов *xylA*, кодирующих ксилозоизомеразу у бактерий рода *Arthrobacter*, изучение их экспрессии в гетерологичном организме.

В результате исследования способности 12 штаммов бактерий рода *Arthrobacter* из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов синтезировать каталитически активную ксилозоизомеразу максимальная продуктивность по исследуемому признаку, составляющая 0,15-0,17 ед/мл, была выявлена у *A. nicotianae* БИМ В-5, *A. oxydans* БИМ В-248, *A. ureafaciens* БИМ В-6, *Arthrobacter* sp. БОС В-1761, *Arthrobacter* sp. БИМ В-2239. Указанные культуры были выбраны в качестве доноров гена *xylA.*

Опираясь на полученные нами ранее данные о невысокой степени комплементарности начальных и концевых последовательностей *xylA* бактерий рода *Arthrobacter* (менее 70%) и обусловленную этим невозможность создания подходящих праймеров, осуществляли прямое клонирование указанных генов в дефицитном по ксилозоизомеразе штамме *E. coli* HB101 *(xylГ)*. Для создания банков генов бактерий *A. nicotianae* БИМ В-5, *A. oxydans* БИМ В-248, *A. ureafaciens* БИМ В-6, *Arthrobacter* sp. БОС В-1761, *Arthrobacter* sp. БИМ В-2239 их хромосомную ДНК выделяли, очищали. Препараты тотальной ДНК и вектор pUC18 обрабатывали рестриктазами *Pst*I, *Bam*HI, *Kpn*I, *Eco*RI, после чего совместно лигировали с получением гибридных плазмид.

Полученными плазмидами трансформировали компетентные клетки *E. coli* HB101. Отбор рекомбинантных клонов *E. coli* HB101 осуществляли на минеральной селективной среде, содержащей ампициллин в качестве селективного маркера, ксилозу в качестве единственного источника углерода, а также пролин, лейцин и тиамин для преодоления ауксотрофности штамма.

В результате проведенных трансформаций были отобраны 5 клонов бактерий *E. coli* HB101, наследующих гены *xylA A. nicotianae* БИМ В-5, *A. oxydans* БИМ В-248, *A. ureafaciens* БИМ В-6, *Arthrobacter* sp. БОС В-1761, *Arthrobacter* sp. БИМ В-2239. Рекомбинанты утилизировали ксилозу и после трех последовательных рассевов до изолированных колоний сохраняли способность к росту на селективной среде. При этом все рекомбинантные штаммы *E. coli* HB101 приобрели способность синтезировать ксилозоизомеразу при росте в среде без ее специфического субстрата – ксилозы, тогда как среди штаммов-доноров гена *xylA* только *A. nicotianae* БИМ В-5 характеризовался конститутивным характером синтеза ферментного белка. Продуктивность по ксилозоизомеразе варьировала от 0,03 ед/мл до 0,17 ед/мл у рекомбинантных бактерий *E. coli* HB101, наследующих *xylA* соответственно штаммов *Arthrobacter* sp. БИМ В-2239 и *Arthrobacter* sp. БОС В-1761.

Для более точной локализации генов *xylA* в клонированных фрагментах ДНК бактерий рода *Arthrobacter* вставки субклонировали в векторе pUC18, а полученные гибридные плазмиды секвенировали с использованием специфических к pUC18 праймеров *oligo 1* и *oligo 2*. Сравнение расшифрованных последовательностей с известными последовательностями из электронных баз данных выявило наличие генов *xylA*, на 73-88% комплементарных генам ксилозоизомераз *Arthrobacter* sp. N.R.R.L. B3728, *A. phenanthrenivorans* Sphe3, *A. arilaitensis* RE117, *A. chlorophenolicus* A6, *A. aurescens* TC1, *Arthrobacter* sp. FB24.

Работа выполнена в рамках проекта Б09-135 Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований.

Литература:

1. *Bhosale S.H., Rao M.B., Deshpande V.V.* Molecular and industrial aspects of glucose isomerase // Microbiol. Rev. – 1996, Vol. 60, № 2, p. 280–300.
2. *Vieille C., Zeikus G.J.* Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2001, Vol. 65, № 1, p. 1–43.

EXPRESSION OF *XYLA* GENES FROM *ARTHROBACTER* BACTERIA IN *ESCHERICHIA COLI* RECOMBINANT STRAINS

[1]Shlakchotko E., [1]Sapunova L., [2]Evtushenkov A.

[1]Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences,Minsk, Belarus
e-mail: ekaterina_shl@mail.ru
[2]Belarusian State University, Minsk, Belarus

Xylose isomerase (D-xylose ketolisomerase, E.C. 5.3.1.5) is the enzyme not showing strict substrate specificity and catalyzing isomerization of a broad spectrum of aldosugars into keto derivatives, e.g. D-xylose into D-xylulose or D-glucose into D-fructose. Xylose isomerase is applied in industrial fabrication of glucose – natural sweeteners derived from renewable starchy materials. Major sources of the enzymes differing in substrate specificity, glucose affinity, temperature and pH optima's, specific activity are microorganisms of genera *Streptomyces, Arthrobacter* [1, 2]. Currently to raise productivity of commercial strains conventional selection methods are widely complemented by recombinant DNA technologies envisaging isolation of genes encoding enzyme with optimal industry-oriented properties and their cloning in chosen microbial host under control of strong promoter [1].

Aim of this investigation is isolation and cloning in *Escherichia coli* of *xylA* genes coding for xylose isomerase of *Arthrobacter* bacteria and further analysis of their expression in heterologous organism.

Studies on the ability of 12 bacterial strains from genus *Arthrobacter* deposited at Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms to synthesize catalytically active xylose isomerase have revealed maximal enzyme productivity 0.15-0.17 U/ml in cultures *A. nicotianae* BIM B-5, *A. oxydans* BIM B-248, *A. ureafaciens* BIM B-6, *Arthrobacter* sp. BOC B-1761, *Arthrobacter* sp. BIM B-2239. The above-mentioned cultures were selected as donors of *xylA* gene.

Based on our previous data stating relatively low complementarity of initial and terminal *xylA* sequences in bacteria of genus *Arthrobacter* (less then 70%) and, as a result, lack of suitable primers, we carried out direct cloning of *xylA* genes in strain *E. coli* HB101 *(xylГ)* deficient in xylose isomerase. To setup gene bank of bacteria *A. nicotianae* BIM B-5, *A. oxydans* BIM B-248, *A. ureafaciens* BIM B-6, *Arthrobacter* sp. BOC B-1761, *Arthrobacter* sp. BIM B-2239 their chromosome DNA was recovered and purified. Total DNA preparations and vector pUC18 were digested with restrictases *Pst*I, *Bam*HI, *Kpn*I, *Eco*RI and ligated to produce hybrid plasmids.

Competent cells of *E. coli* HB101 were transformed with obtained plasmids. Screening of recombinant *E. coli* HB101 variants was performed on selective marker, xylose as the sole carbon source and prolin, leicine and thiamin to overcome strain auxotrophicity.

Completed transformations resulted in 5 bacterial clones of *E. coli* HB101 inheriting *xylA* genes of *A. nicotianae* BIM B-5, *A. oxydans* BIM B-248, *A. ureafaciens* BIM B-6, *Arthrobacter* sp. BOC B-1761, *Arthrobacter* sp. BIM B-2239.

The recombinants utilized xylose and after 3 sequential transfers yielding isolated colonies they retained ability to grow on selective medium. All recombinant strains of *E. coli* HB101 acquired capacity to synthesize xylose isomerase on media lacking its specific substrate – xylose, whereas among strains – donors of *xylA* gene only *A. nicotianae* BIM B-5 was distinguished by constitutive synthesis of enzyme protein. Xylose isomerase productivity varied from 0.03 U/ml to 0.17 U/ml in recombinant bacteria *E. coli* HB101 inheriting *xylA* gene of strains *Arthrobacter* sp. BIM B-2239 и *Arthrobacter* sp. BOC B-1761 respectively.

For more precise localization of *xylA* genes in cloned DNA fragments of *Arthrobacter* bacteria the inserts were subcloned in vector pUC18 and the obtained hybrid plasmids were sequenced using primers oligo 1 and oligo 2 specific to pUC18. Comparison of decoded sequences with sequences available in electronic database revealed that *xylA* genes are complementary to xylose isomerase genes of *Arthrobacter* sp. N.R.R.L. B3728, *A. phenanthrenivorans* Sphe3, *A. arilaitensis* RE117, *A. chlorophenolicus* A6, *A. aurescens* TC1, *Arthrobacter* sp. FB24 by 73-88 %.

The work was realized within the framework of project B09-135 financed by Belarus National Foundation of Basic Research.

References:

1. *Bhosale S.H., Rao M.B., Deshpande V.V.* Molecular and industrial aspects of glucose isomerase // Microbiol. Rev. – 1996, Vol. 60, № 2, p. 280–300.
2. *Vieille C., Zeikus G.J.* Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2001, Vol. 65, № 1, p. 1–43.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОЦИНОВ БИФИДОБАКТЕРИЙ

Щетко В.А., Головнева Н.А.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: shchatko@mbio.bas-net.by

Одной из глобальных проблем современного мира является поиск новых подходов для борьбы с инфекционными заболеваниями. Быстрое развитие устойчивости к антибиотикам у патогенных бактерий, сопровождающееся распространением генов антибиотикорезистентности, ограничения в использовании антибиотиков и химических консервантов в пищевой промышленности, делают актуальным разработку антибактериальных препаратов с новыми механизмами действия. В ряде случаев для снижения титров патогенных микроорганизмов успешно применяются бактериоцины – бактериальные белково-пептидные соединения, синтезируемые на рибосомах, обладающие антимикробным действием. В настоящее время бактериоцины рассматриваются как факторы антагонизма, обеспечивающие регуляцию популяции бактерий и колонизационную устойчивость организма человека и животных к патогенным микроорганизмам. Особый интерес, как с научной, так и с практической точки зрения представляют бактериоцины и бактериоцинподобные соединения бактерий нормальной микрофлоры человека и животных – молочнокислых и бифидобактерий.

В результате проведенных экспериментов нами установлено, что в процессе роста некоторые штаммы бифидобактерий *Bifidobacterium adolescentis* и *Bifidobacterium bifidum* продуцируют термостабильные соединения пептидно-белковой природы, которые обладают антимикробной активностью. По свойствам и спектру антибактериального действия эти соединения соответствуют принятому в настоящее время определению бактериоцинов. Бактериоцины, продуцируемые *B.adolescentis* и *B.bifidum*, оказывают ингибирующее действие в основном на близкородственные виды, а также некоторые грамположительные бактерии родов *Bacillus, Enterococcus, Staphylococcus*. Установлено, что бактериоцины бифидобактерий обладают бактерицидным действием на клетки чувствительных микроорганизмов. Высокоочищенные бактериоцины *B.adolescentis* обладают более выраженным ингибирующим эффектом по сравнению с *B.bifidum* и способны ингибировать рост патогенных микроорганизмов родов *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Klebsiella.*

Бактериоцины, продуцируемые бифидобактериями, характеризуются термостабильностью, сохраняют активность в широком диапазоне pH от 2 до 9, полностью инактивируются трипсином, но устойчивы к действию других протеолитических ферментов. По данным электрофоретического анализа молекулярная масса бактериоцинов *B.adolescentis* составляет ~12 kDa. В составе бактериоцина *B.adolescentis* обнаружено 16 аминокислот. Около половины (48%) приходится на долю гидрофобных аминокислот аланина, лейцина, изолейцина, пролина, метионина, фенилаланина

Максимальный уровень продукции антимикробных пептидов установлен к 12-15 час инкубации клеток, что соответствует концу логарифмической фазы роста бактерий. Установлено, что накопление бактериоцинов в среде роста бактерий зависит от физико-химических факторов: pH, температуры, состава среды культивирования. Усиление бактериоцинпродукции наблюдается при отклонении от оптимальных для роста бактерий условий культивирования. При выращивании бифидобактерий на средах с минимальным количеством источника углерода (0,1-0,5%), повышении или понижении температуры культивирования на 5ºC, поддержании на постоянном уровне pH среды культивирования (pH-статировании) продукция бактериоцинов увеличивается в 4-6 раз. При периодическом культивировании бифидобактерий в ферментерах сохраняются обнаруженные закономерности продукции антибактериальных соединений.

BIOLOGICAL ACTIVITY AND SOME PROPERTIES OF BIFIDOBACTERIAL BACTERIOCINS

Shchatko V.A., Golovnyova N.A.

Institute of Microbiology, National Academy of Sciences, Belarus
e-mail: shchatko@mbio.bas-net.by

One of global challenges of modern world is search of new approaches to control infections diseases. Rapid development of resistance to antibiotics in pathogenic bacteria accompanied by spread of drug resistance genes and limitations in application of antibiotics and chemical conservation agents in food industry make relevant elaboration of antibacterial products with new mechanisms of action. In some cases bacteriocins – bacterial protein-peptide compounds synthesized on ribosomes and showing antimicrobial activity are successfully used to reduce titer of pathogenic microorganisms. Nowadays bacteriocins are regarded as antagonistic factors ensuring regulation of bacterial population and resistance of human and animal bodies to colonization by pathogenic microbial species. Special interest both from theoretical and practical viewpoints arouse bacteriocins and bacteriocin-like substances produced by bacteria of normal human and animal microbiota – lactic acid bacterial and bifidobacterial species.

Completed experiments have revealed that in the course of growth some bacterial strains *Bifidobacterium adolescentis* and *Bifidobacterium bifidum* produce thermostable peptide-protein complexes possessing antimicrobial activity. In properties and spectrum of antibacterial action these compounds correspond to recognized definition of bacteriocins. Antibacterial agents produced by *B.adolescentis* and *B.bifidum* display inhibitory action mainly on closely related species and certain gram-positive bacteria of genera *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*. It was found that bifidobacterial bacteriocins exert biocidal action on sensitive microbial cells. Highly purified bacteriocins of *B.adolescentis* show more pronounced inhibitory effect than *B.bifidum* and they are able to inhibit growth of pathogenic microorganisms representing genera *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Klebsiella*.

Bacteriocins produced by bifidobacteria are characterized by thermal stability, retain activity in a broad pH range 2 to 9, are totally inactivated by trypsin and show tolerance to activity to other proteolytic enzymes. According to electrophoresis data molecular weight of *B.adolescentis* bacteriocins constitutes approximately 12 kDa. 16 amino acids were identified in composition of *B.adolescentis* bacteriocin. Almost half of them (48%) are represented by hydrophobic amino acids alanine, leucine, isoleucine, proline, methionine, phenylalanine.

Maximum level of antimicrobial peptide production was recorded by 12-15 h of cell incubation which corresponds to the end of log-phase of bacterial growth. It was determined that accumulation of bacteriocins in the medium depends on physical-chemical factors: pH, temperature, composition of cultural media. Increased of bacteriocin generation is observed when deviation from optimal growth conditions occurs. Growth of bifidobacteria with minimal concentration of carbon source (0,1-0,5%), rise or fall of fermentation temperature by 5°C, pH maintenance at constant value (pH-static regimen) result in upsurge of bacteriocin production 4-6-fold. Batch bifidobacterial culture in fermenters proves mechanisms established for synthesis of antibacterial compounds.

БИОСИНТЕЗ L-ЛЕЙЦИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕМБРАННОГО БИОРЕКТОРА

Якимович Н.Н., Бильдюкевич А.А., Гринько В.Н., Якимович И.В.

ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь
e-mail: bildyukevich@rambler.ru

L-лейцин является незаменимой аминокислотой, которая находит широкое применение в медицине. Существует несколько способов получения аминокислот и, в частности, лейцина: экстракция из белковых гидролизатов, микробиологический, ферментативный и химическим синтез. В настоящее время все большую популярность завоевывает метод микробного синтеза, основанный на способности к сверхсинтезу аминокислот специальными штаммами-продуцентами. Существенным преимуществом данного способа является то, что получаемая таким образом аминокислота существует только в L-форме, и соответственно, отпадает необходимость в трудоемких стадиях разделения стереоизомеров аминокислот и рацемизации ненужного D-изомера как, например, в случае получения лейцина химическим синтезом.

Наш подход при разработке процесса биосинтеза L-лейцина заключался в использовании мембранного биореактора, состоящего из лабораторного ферментатора вместимостью 7,0 дм^3 с нижним электромагнитным перемешивающим устройством, фильтрующего устройства, емкости для приема фильтрата культуральной жидкости, перистальтического насоса для подачи в ферментатор питательной среды. Ферментатор оборудован системой автоматического поддержания температуры, pH ферментационной среды, концентрации растворенного кислорода воздуха (Рисунок).

Рис. Лабораторный мембранный биореактор

С использованием мембранного биореактора были проведены процессы биосинтеза L-лейцина, когда продукты метаболизма выводили из состава ферментационной среды, а биомассу продуцента возвращали в ферментатор. Результаты исследований показали, что производительность процесса биосинтеза лейцина с использованием мембранного реактора была увеличена на 30%.

THE PROCESS OF L-LEUCINE BIOSYNTHESIS USING MEMBRANE BIOREACTOR

Yakimovich N.N., Bildyukevich A.A., Hryn'ko V.N., Yakimovich I.V.

Institute of physical organic chemistry of National academy of science of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: bildyukevich@rambler.ru

L-Leucine is an essential amino acid, which is widely used in medicine. There are several ways to obtain amino acids and particularly leucine: extraction from protein hydrolysates, microbial, enzymatic and chemical synthesis. Currently, more and more popular method of gaining microbial synthesis based on the ability to enhanced synthesis of amino acids with the special producer strain. Significant advantage of this method is that thus obtained amino acid exists only in the L-form, and accordingly, there is no need for labor-intensive stages of the separation of stereo isomers of amino acids and the racemization of unwanted D-isomer, such as in the case of leucine chemical synthesis.

Our approach in the development of the process of L-leucine biosynthesis was by using membrane bioreactor, consisting of a laboratory fermenter with a capacity of 7,0 dm^3 with a lower electromagnetic mixing devices, filtering devices, tank for the reception of culture filtrate, the peristaltic pump to feed the fermenter by feeding media. Fermenter equipped with the system of automatic maintenance of temperature, pH, concentration of dissolved oxygen (Figure).

Fig. Laboratory Membrane Bioreactor

Using a membrane bioreactor were conducted biosynthesis of L-leucine in the conditions when metabolic products were removed from the fermentation medium and the biomass of the producer strain returned to the fermenter. The results showed that the productivity of L-leucine biosynthesis using a membrane reactor was increased to 30%.

ACCESSING MICROBIAL DIVERSITY: A SYSTEMATIC APPROACH FOR NOVEL BIOACTIVE MOLECULES DISCOVERY

Hemant K. Gautam

Institiute of Genomics and Integrative Biology,
Mall Road, University Campus Delhi-110 007 India
e-mail: hemant@igib.res.in

Microorganisms have provided a rich source of natural–products which comes only 1% of the total existing microbes. The combinational of advanced techniques for the study of rest 99% microorganisms will certainly lead to the discovery of many novel exciting bioactive molecules. Recent Technological advances and the development of new molecular techniques have revolutionized the screening of natural products and offer a unique opportunity to re-established natural products as major source of bioactive leads molecules. A very promising approach in this respect is to explore the microbial community (99% yet to be explore) by cloning genes of uncultured microorganisms (Metagenomic approach) or single cell genomics as a new genetic resource or to isolate microorganisms from most diversified environments.

In the present investigation combination of both the approaches were used (culture dependent and culture independent) to explore the microbial community of many diversified locations i.e. Kargil, and live mud volcano from Andman & Nicobar Islands, and other high altitude places of India. Due to presence of harsh climatic conditions, environmental samples from this region could be a potential source for exploring the new microbes, for novel bioactive molecules. For the different screening purposes metagenomic libraries were constructed in pKS (stratagene) and SuperCos I (stratagene). Gene clone analysis of environmental DNA indication the abundance of number of very peculiar type of bacterial presence were found. These isolates were further identified through 16 r RNA gene sequence and found 94-98 % similarity with known and unknown micro organisms. While combining these all at least three promising bioactive molecules were screened. One psycrophilic strain produce canthxanthin with cis and trans isomers while other strain produces a radioprotective proteins and antioxidant and antimicrobial properties. Different strategies for bioactive molecules from microbes will be discussed..

УСЛОВИЯ НАКОПЛЕНИЯ ТОКОФЕРОЛОВ КЛЕТКАМИ МИКРОВОДОРОСЛИ *EUGLENA GRACILIS*

Мокросноп В.М., Золотарева Е.К.

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: membrana@ukr.net

Микроводоросль Euglena gracilis как представитель отдельной ветви эволюции принадлежит к царству дискокристат, что уже свидетельствует об особой организации этого организма. Значительный интерес исследователей вызывает особая функциональная организация митохондриону Euglena gracilis, являющийся факультативно анаэробным. При наличии кислорода он функционирует почти также как и большинство митохондрий, а в анаэробных условиях использует ацетил-КоА и фумарат в качестве акцепторов электронов с последующим синтезом жирных кислот, с участием которых энергия запасается в форме воска [1]. Еще одной особенностью митохондриону является наличие фермента, присущего гидрогеносомама, что не исключает возможности продуцирования молекулярного водорода этими организмами. Euglena gracilis также не является исключительно автотрофом или гетеротрофы, она использует обе стратегии питания в процессе жизнедеятельности, включая промежуточную. Euglena способна как к гетеротрофному, так и к автотрофному типу питания, а также к промежуточному - миксотрофному. В темноте водоросль становится гетеротрофной и, теряя хлорофилл, обесцвечивается. После освещения вновь приобретает зеленый цвет и переходит до автотрофного питания за счет фотосинтеза. Как гетеротроф Euglena gracilis поглощает органические молекулы (этанол, ацетат, глюкозу, сукцинат, лактат, гликолат, пептон), метаболизируя их в качестве источник углерода и энергии в анэробном дыхании. Из-за простоты культивирования, быстрого роста, нетоксичности и высокого содержания биологически активных веществ *Euglena gracilis* представляет большой интерес как объект биотехнологических разроботок. Культура *E. gracilis* отличается высоким содержанием белка, полиненасыщенных жирных кислот, а также витамина С, каротина и витамина Е – α-токоферола. По содержанию последнего *E. gracilis* далеко опережает другие растительные источники этого витамина [2].

В условиях миксотрофного роста культура *E. gracilis* способна накапливать до 1 мг α-токоферола на 1 г сухой массы [2], причем экзогенно добавленный этанол в большей степени стимулировал накопление α-токоферола по сравнению с экзогенно добавленной глюкозой, которая способствовала накоплению биомассы. Целью настоящей работы было изучения влияния метанола, формиата и ацетата на рост клеток *E. gracilis* и накопление α-токоферола в условиях перехода от анаэробного к аэробному культивированию.

Клетки *E. gracilis* выращивали в колбах на модифицированной жидкой среде 3N BOLD (UTEX) при круглосуточном освещении белами люминесцентными лампами. Интенсивность освещения на поверхности колб соответствовала 100 мкмоль фотонов•$м^2$•$с^{-1}$. Добавки вносили в середине экспоненциальной фазы роста до концентрации 50 мМ. Содержание α-токоферола определи спектрофотометрическим методом, экстрагируя его из клеток петролейным эфиром и определяя оптическое поглощение при 450 нм. Культуры переводили в анаэробный режим на 10-е сутки выращивания, удаляя из среды культивирования соединения серы путем трехкратной промывки клеток средой без серы. В этих условиях фотосинтетическое выделение кислорода подавляется из-за повреждения фотосистемы II, тога как дыхание сохраняется на исходном уровне, вследствие чего в суспензии, изолированной от атмосферы, формируется анаэробная среда. Углеродное питание культур в таких анаэробных условиях поддерживали за счет экзогенных органических добавок. После 5 суток анаэробного культивирования колбы открывали, в среду вносили сульфаты калия и магния. Таким образом, концентрация кислорода в среде инкубации клеток, адаптированных к анаэробному культивированию резко возрастала.

Показано, что экзогенные источники углерода – метанол, формиат и ацетат положительно влияли на накопление α-токоферола клетками *E. gracilis* в условиях перехода от анаэробного в аэробному существованию.

Литература:

1.*Hoffmeister M., van der Klei A., Rotte C. , Koen W. A. et al. Euglena gracilis* Rhodoquinone:Ubiquinone Ratio and Mitochondrial Proteome Differ under Aerobic and Anaerobic Conditions - J.Biol.Chem., 2004, 279, N 21, P. 22422–22429.
2.*Afiukwa C. A., Ogbonna J. C.* Effects of mixed substrates on growth and vitamin production by *Euglena gracilis* - Afr. J. Biotechnol., 2007, V. 6, N 22, P. 2612-2615.

МЕТАНОЛ КАК СТИМУЛЯТОР РОСТА КЛЕТОК *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*.

Степанов С.С., Золотарева Е.К.

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: membrana@ukr.net

Одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* привлекает внимание исследователей, работающих в областях биохимии, молекулярной биологии, биоэнергетики и биотехнологии. Благодаря простоте культивирования и полностью расшифрованному геному *C. reinhardtii* используется в качестве модельного объекта в биохимических и молекулярно биологических исследованиях. Культура *C. reinhardtii* способна к светозависимому выделению водорода в анаэробных условиях, что позволяет считать ее перспективным продуцентом биоводорода в альтернативной энергетике.

В 2010 году американские ученые исследовали возможность использования *C. reinhardtii* з трансгенными хлоропластами для получения терапевтических белков человека, таких как инсулин и интерферон [1].

В связи с высоким потенциалом биотехнологического применения C. reinhardtii актуальным вопросом становится поиск условий и кофакторов, стимулирующих рост и обеспечивающих максимальный выход биомассы в короткие сроки. Ранее нами было установлено стимулирующее действие 50 мМ метанола на рост автотрофной культуры C. reinhardtii. Стимулирующий эффект проявляется в улучшении функционального состояния фотосинтетического аппарата, увеличении скорости фиксации углекислоты и уменьшении потерь CO2 в цикле фотодыхания. При культивировании в течение 7 суток с добавлением 50 мМ метанола объем уплотненных клеток увеличивался на 34%, средний период генерации клеток в культуре снижался на 28% по сравнению с контролем. Обнаружено также стимулирующее воздействие небольших концентраций метанола на скорость темнового дыхания *C. reinhardtii.*

Открытым остается вопрос участия ферментов в первой реакции окисления метанола до формальдегида, поскольку у растений отсутствует специфический фермент окисления метанола. Для установления участия пероксидазной активности каталазы (EC 1.11.1.6) в окислении метанола мы опредяляли активность каталазы в автотрофной культуре C. reinhardtii при добавлении 50 мМ метанола и в контрольних условиях, без метанола.

Пероксидазная активность	Каталазная активность
$CH_3OH + H_2O_2 \rightarrow HCOH + H_2O$	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$

Отбор проб для определения активности каталазы проводили после 1-го, 6-и и 24-х час инкубации с метанолом. Определение активности клеточной каталазы проводили путем внесения суспензии живых клеток в среду с одинаковой концентрацией H_2O_2. Скорость выделения кислорода регистрировали амперометрично с использованием закрытого электрода Кларка.

Полученные результаты показывают положительное влияние метанола на экспрессию гена каталазы, проявляющееся в двукратном повышении активности энзима после 6 часов инкубации с метанолом.

Литература:

1.*Rasala B.A., Muto M., Lee P.A.* // Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of Chlamydomonas reinhardtii - Plant Biotechnology Journal. – 2100. – 8(6). – P. 719 – 733.

Фундаментальные и прикладные аспекты применения биологически активных веществ: биомедицина

Fundamental and Applied Problems of Application of Bioactive Substances: Biomedicine

Спонсор Конференции

BIO-RAD

BIO-RAD Laboratories

Обладнання і реагенти для дослідницьких, медичних та промислових лабораторій

Компанія BIO-RAD (США) є найбільшим світовим виробником лабораторного та аналітичного обладнання. На сьогодні BIO-RAD представляє широку гамму обладнання для дослідницьких та промислових лабораторій:

- **ПЛР-ампліфікатори CFX96 Real Time**
- **Обладнання та реагенти для геном них та протеомних досліджень**
- **Обладнання для рідинної хроматографії**
- **Обладнання, реагенти і витратні матеріали для електрофорезу та блоттінгу**
- **Системи анализу зображення. Документуючі системи. Програмне забеспечення**

За додатковою інформацією щодо технічних можливостей та вартості продукції компанії BIO-RAD просимо Вас звертатися до регіонального представництва компанії в Україні за адресою:

Київ, 02160, проспект Возз'єднання 7а, оф. 315
Тел.: (050) 446-21-13, (050) 448-34-56
e-mail: office@bio-rad.com.ua
www.bio-rad.com

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПОЛИФЕНОЛОВ ИЗ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА БУРАЧНИКОВЫЕ НА ФУНКЦИЮ ПОЧЕК У КРЫС

Азарова О.В., Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Лампатов В.В.

Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия
e-mail: kunaza@rol.ru, kunevitch@mail.ru

В настоящее время диапазон объектов исследования лаборатории по изучению лекарственных растений Алтайского государственного медицинского университета, сотрудничающей с лабораторией химии природных хиноидных соединений Тихоокеанского института биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН (г. Владивосток), расширен за счет экспериментальных фитопрепаратов дальневосточной флоры, полученных биотехнологическим способом. Одним из направлений исследований является изучение влияния полифенольных комплексов клеточной культуры дальневосточных растений, представленных олигомерами кофейной кислоты, на функцию почек.

Полифенольные комплексы клеточных культур воробейника краснокорневого и незабудочника шелковистого получены в Тихоокеанском институте биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН. Данные комплексы выделяли из культур каллусов, созданных на основе дикорастущих растений воробейник краснокорневой *(Lithospermum erythrorhizon Sieb. et Zucc., сем. Бурачниковые)* и незабудочник шелковистый *(Eritrichium sericeum Lehm., сем.* Бурачниковые). Культуру клеток воробейника и незабудочника (штамм ВК-39 ВСКК-ВР №36 и культура Er-1 соответственно) выращивали с использованием питательных сред $W_{K/IAA}$ и $W_{B/NAA}$ в течение месяца.

Фармакологические исследование проводили на беспородных белых крысах обоего пола массой 180-210 г, измеряя суточный объем мочи, в которой определяли содержание креатинина, экскреция которого служили мерой клубочковой фильтрации, а также ионов калия и натрия для расчета суточной экскреции электролитов. Исследуемые фитокомплексы вводили перорально в смеси с 2% крахмальной взвесью в суточной дозе 100 мг/кг (незабудочник) и 250 мг/кг (воробейника). Длительность приема составляла 14 дней.

Диуретическое действие обоих фитокомплексов реализовалось в достоверном увеличении суточного диуреза, сопровождающимся ростом экскреции креатинина и калия. Вызванная фитопрепаратами полиурия достигала максимума к десятому дню применения препарата воробейника и к одиннадцатому дню введения препарата незабудочника, превышая исходный уровень мочеотделения на 64% и на 104% соответственно, и оставалась стабильно высокой спустя два дня после отмены препаратов. Аналогичная динамика прослеживалась и в отношении калийуретической реакции, которая рассматривается как нежелательное действие препаратов. При этом прирост экскреции калия под действием полифенолов незабудочника (40-48%) уступал по степени выраженности калийурезу, вызванному фитопрепаратом воробейника (46-76%), что позволяет сделать вывод о более слабом проявлении побочного эффекта фитокомплексов незабудочника. Более выраженным влиянием на почечную экскрецию ионов натрия обладали полифенолы незабудочника. Начиная с девятого дня введения последнего, был зарегистрирован рост натрийуреза, достоверно превышающий контрольный уровень в 1,5 раза.

Длительное использование полифенольных комплексов приводило к некоторому увеличению скорости клубочковой фильтрации, о чем свидетельствует появившаяся тенденция к усилению экскреции креатинина. Возрастание диуреза, сопровождающееся уменьшением реабсорбции электролитов, на фоне экскреции креатинина позволяет связать мочегонное действие полифенолов воробейника и незабудочника с увеличением скорости клубочковой фильтрации и угнетением канальцевой реабсорбции.

Отсутствие четкой корреляции между увеличением суточного диуреза и ростом фильтрации жидкости в почечных клубочках, а также отсутствие выраженного натрийуреза при применении полифенолов воробейника позволяет предположить, что доминирующую роль в его диуретическом действии играет угнетение реабсорбции воды в почечных канальцах, локализованное, главным образом, в нисходящем отделе петли Генле нефрона крыс.

Сравнительная оценка степени выраженности действия двух изученных фитокомплексов олигомеров кофейной кислоты на функцию почек с учетом их количественного содержания в клеточных культурах позволила выявить определенные химико-фармакологические закономерности и выдвинуть предположение об определяющем вкладе данных дериватов в реализацию фармакологического действия. Учитывая некоторые различия в химическом составе полифенолов из клеточной культуры незабудочника и клеточной культуры воробейника, можно предположить, что усиление экскреторной функции почек под влиянием препаратов воробейника и незабудочника связано с наличием в их составе олигомеров кофейной кислоты - рабдозиина и розмариновой кислоты. Так, фитокомплекс незабудочника, характеризующийся более высоким содержанием полифенольных соединений и наличием уникального тримера кофейной кислоты - эритрихина, проявил в эксперименте более выраженную фармакологическую активность.

В условиях длительного применения полифенольных комплексов клеточных культур растений семейства Бурачниковые: воробейника краснокорневого и незабудочника шелковистого, установлено усиление экскреторной функции почек, более выраженное при применении фитопрепарата незабудочника.

THE POLYPHENOLS FROM CELL CULTURE OF BORAGINACEAE FAMILY PLANTS: THE COMPARATIVE ASSESSMENT OF EFFECT ON RENAL FUNCTION IN RATS

Azarova O.V., Bryukhanov V.M., Zverev Ya.F., Lampatov V.V.

Altai State Medical University, Barnaul, Russia
e-mail: kunaza@rol.ru, kunevitch@mail.ru

Currently the range of the research materials at the laboratory for the study of medicinal plants of the Altai State Medical University collaborating with the laboratory of chemistry of quinoid compounds at the Pacific Institute of Bioorganic Chemistry (Far Eastern Branch of RAS, Vladivostok), becomes wider due to experimental phytodrugs of Far Eastern flora obtained by means of biotechnological method. One of the research areas is studying the effect of polyphenol complexes of cell cultures represented by caffeic acid oligomers on renal function.

Polyphenol complexes of cell cultures of purple gromwell and Eritrichium sericeum were obtained at the Pacific Institute of Bioorganic Chemistry (Far Eastern Branch of RAS). The given complexes were isolated from the callus cultures, based on wild plants Lithospermum erythrorhizon Sieb. et Zucc and Eritrichium sericeum Lehm. (Boraginaceae). Cell culture of purple gromwell and Eritrichium sericeum (strain BK-39, All-Russian Collection of cell cultures of higher plants № 36 and the culture Er-1, respectively) was growing for a month using a nutrient media the WK/IAA and the WB/NAA.

Pharmacological study was carried out on outbred albino rats of both sexes weighing 180-210 grams. The daily volume of urine was measured evaluating the content of creatinine (creatinine excretion being a measure of glomerular filtration), as well as the content of potassium and sodium ions to calculate the daily excretion of electrolytes. The investigated phytocomplexes were given orally in combination with 2% starch suspension at a daily dose of 100 mg/kg (gromwell) and 250 mg/kg (Eritrichium) for 14 days.

Diuretic effects of both phytocomplex manifested in a significant increase of daily diuresis, which was accompanied by increasing excretion of creatinine and potassium. Herbal preparations induced polyuria, which reached maximum by the tenth day of the gromwell polyphenol complex and the eleventh day of Eritrichium polyphenol complex administration. The level of urinary excretion exceeded the initial one by 64% and 104% respectively persisting consistently high for two days after drug discontinuation. Similar dynamics was observed in regard to kaliyuretic reaction that is considered to be undesirable effect of drugs. At the same time the increase of potassium excretion under the influence of Eritrichium polyphenols (40-48%) was inferior to the severity of kaliyuresis caused by gromwell polyphenols (46-76%). This allows to conclude that Eritrichium phytocomplexes have milder side effects. Eritrichium polyphenols had a more marked effect on the renal excretion of sodium ions. On the ninth day of drug administration an increase in natriuresis was reported exceeding the control level 1,5 times.

Prolonged use of polyphenol complexes leads to some increase in glomerular filtration rate. It is proved by a tendency to increased creatinine excretion. The increase in diuresis accompanied by a creatinine excretion and decrease in reabsorption of electrolytes allows to link the diuretic action of both polyphenols to increased glomerular filtration rate and tubular reabsorption suppression.

Clear correlation between the increase in daily diuresis and increased filtration in the renal glomeruli was not registered. In addition, there were no marked natriuresis when gromwell polyphenols were applied. These facts suggest that the inhibition of water reabsorption in renal tubules, localized mainly in the descending part of Henle loop in rats' nephron is the dominant factor of diuretic effect.

Comparative assessment of the degree of activity of two studied phytocomplexes based on caffeic acid oligomers on renal function according to their quantitative content in cell cultures was carried out. This assessment has identified certain chemical and pharmacological patterns and allowed to put forward the assumption that the given derivatives have a decisive contribution to the accomplishment of pharmacological action. Taking into consideration some differences in chemical composition of polyphenols from Eritrichium cell culture and gromwell cell culture, we can assume that the enhancement of excretory kidney function under the influence of these drugs is due to the presence of caffeic acid oligomers - rabdoziin and rosmarinic acid. Thus Eritrichium phytocomplex characterized by a higher content of polyphenol compounds and the presence of an unique trimer of caffeic acid - eritrihin, showed more pronounced pharmacological activity during the experiment.

The enhancement of excretory kidney function has been established under the condition of long-term administration of polyphenols from cell culture of Boraginaceae family plants: Lithospermum erythrorhizon Sieb. et Zucc. and Eritrichium sericeum Lehm, the effect being more significant when using Eritrichium phytopreparation.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЛАФЕНА С ЭРИТРОЦИТАМИ

[1]Алексеева О.М., [1]Бинюков В.И., [1]Миль Е.М., [1]Албантова А.А., [2]Ягольник Е.А., [1]Кременцова А.А., [1]Шибряева Л.С., [1]Кривандин А.В., [1]Шаталова О.В., [1]Голощапов А.Н., [1]Бурлакова Е.Б., [3]Ким Ю.А.

[1]Институт биохимической физики РАН, Москва, Россия
e-mail: olgavek@yandex.ru
[2]Тульский государственный университет, Тула, Россия
e-mail: yea_88@mail.ru
[3]Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия
e-mail: yuk01@rambler.ru

Мелафен – регулятор роста растений - гетероциклическое гидрофильное фосфорорганическое соединение, синтезированное в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова. Мелафен представляет собой меламиновую соль бис(оксиметил),фосфиновой кислоты и получается в одну стадию с высоким выходом из промышленно доступных продуктов [1]. Мелафен повышает стрессоустойчивость растений в условиях переохлаждения и засухи, усиливая эффективность энергетического обмена, при этом меняется жирнокислотный состав и микровязкость микросомальных и митохондриальных мембран в растительной клетке [2].

При тестировании действия этого биологически активного вещества, на объектах животного происхождения было обнаружено значительное изменение формы эритроцитов по результатам изучения эритроцитарных имиджей с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Основной целью работы было выяснение мишеней воздействия мелафена и определение не повреждающих животные клетки концентраций мелафена.

Было обнаружено воздействие мелафена на чисто липидные бислойные мембраны гигантских мультиламмелярных липосом, сформированных из нейтрального искусственного фосфолипида – димиристоилфосфатидилхолина. Мелафен значительно изменял картину микродоменной организации липидов. Используя модельный подход вариабельной скорости нагрева образцов, обнаружили сложную доза-зависимость. Мелафен в больших концентрациях разрыхлял структуру растворимого белка - бычьего сывороточного альбумина, Учитывая данные, полученные в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, о формировании мелафеном в водной среде супрамолекулярных структур с участием воды [4] можно предположить, что именно такие структуры меняют микродоменную организацию в уязвимых тонко организованных и лабильных модельных биологических объектах.

Однако при тестировании на липосомах, сформированных из смеси природных фосфолидов, и на тенях эритроцитов не было обнаружено значимого влияния препарата. Т.е. мелафен структурно воздействует только на достаточно лабильные конструкции. Поэтому можно было заключить, что структурные воздействия гидрофильного мелафена могут осуществляться через водную фазу

При исследовании целых выделенных эритроцитов была обнаружена доза-зависимая утечка K^+ через Ca^{2+}- зависимые K^+-каналы при добавлении мелафена. Необходимо отметить, что эритроциты, получившие в процессе выделения глюкозу, значительно менее повреждались при добавлении мелафена. Это показано при тестировании методом АСМ, и при регистрации калиевой утечки под действием ионофора А23187. Т.о. мелафен влияет на функции в зависимости от метаболизма клеток. Для сравнения были проведены исследования действия мелафена на клетки с полной системой трансдукции – лимфоциты и клетки асцитной карциномы Эрлиха. Были обнаружены доза-зависимое угнетение передачи Ca^{2+}-сигналов и, соответственно, инициация вхождения в апоптоз.

Литература:

1. *Фаттахов С.Г., Резник В.С., Коновалов А.И.* // В сб. докладов 13-ой Международной конференции по химии соединений фосфора.- С.Петербург, 2002, с. 80.
2. *Фаттахов С.Г, Лосева А.И., Коновалов А.И., Резник В.С. и др.* // ДАН, 2004, т. 394, с. 127-129.
3. *Жигачева И.В., Фаткуллина Л.Д., БурлаковаЕ.Б, Шугаев А.И. и др. //* Биологические мембраны, 2008, т. 25, №2, с. 128-134.
4. *Рыжкина И. С, Муртазина Л. И., Киселева Ю. В.,Коновалов А. И.* // “Свойства супрамолекулярных наноассоциатов, образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ”, ДАН, 2009, т. 428, № 4, с. 487–491

THE INVESTIGATION OF MELAFEN ACTION TO THE ERYTHROCYTES

[1]Alekseeva O.M., [1]Binyukov V.I., [1]Mill E.M., [1]Albantova A.A., [1]Krementsova A.V., [1]Shibryaeva L.S., [1]Krivandin A.V., [1]Shatalova O.V., [1]Goloshapov A.N., [1]Burlakova E.B., [2]Yagolnik E.A., [3]Kim Yu.A.

[1]Institute of Biochemical Physics. NM Emanuel Academy of Sciences, Moscow, Russia
e-mail: olgavek@yandex.ru,
[2]Tulsky State University, Tula, Russia
e-mail: yea_88@mail.ru
[3] Institute of Cell Biophysics, Pushchino, Russia
e-mail: yuk01@rambler.ru

Melafen is a plant growth regulator - heterocyclic organophosphor compound, synthesized at the A. E. Arbuzov Institute of organic and physical chemistry RAS. Melafen is the hydrophylic melamine salt bis(oxymethyl) phosphinic acid and is acquired by one stage with high stepping out of industrially available products [1]. Melafen raises the plants stress-resistance in the conditions of overcooling and drought, increasing the effectiveness of energy metabolism, in this case changes the fatty acid composition and the microviscosity of microsomal and mitochondrial membranes in vegetable cell [2].

When test action of this biologically active substance, at facilities of animal origin the great shape change of erythrocytes images, obtained by means of magnetically force microscopy was found. Basic the working objective was the targets clearing Melafen action and definition of not damaging the cell animals of concentrations of Melafen.

Was found Melafen action on purely lipid belayer membrane of giant multulammelar liposomes, formed from neutral artificial phospholipid - dimyristoilphosphatidylcholine. Melafen much changed the picture of microdomaines organization of lipids. Employing modeling approach of variable speed of heat of pattern, found the complex dose-dependent picture.

Melafen loosed the structure of the soluble protein - the bovine serum albumin.

Taking into account data obtained the A. E. Arbuzov Institution of organic and physical chemistry, about formation by the Melafen in aqueous solutions of supramolecular structures involving of water molecules [4] it can be assumed that just such the structures change the microdomaines organization in attackable delicately organized and labile structures.

However when test on liposomes, formed from mixture of nature phospholipids and on the erythrocyte ghosts was not found significant influence of Melafen. Thus Melafen structurally operates only on fairly labile construction. This is why it is possible was to conclude, that structural action may be performed through aqueous phase

When studying the native outlined erythrocytes was found the dose dependent leakage K^+ through Ca^{2+} - the dependable K^+-channels. It should be noted that erythrocytes, received in preparation procedure of the glucose, as when test by AFM (atomic force microscopy) method, and in registration of potassium the leakage by ionophor A23187 were much less vulnerable for Melafen. Obviously, Melafen influence of cell function. Indeed, when by comparison was investigations are pursued Melafen action on cells with self-contained system of transduction - the lymphocytes and the cells of ascetic Ehrlich carcinoma, then the dose dependent oppression of cession of Ca^{2+} - signals and respectively, initiation of signing on apoptosis were found.

References:

1. *Fattachov S.G., Reznik V. S., Konovalov A. I.* // In set of articles. Reports of 13th international conference on chemistry of phosphorus compounds. - S. Petersburg, 2002, S.. 80.
2. *Fattachov S.G., Loseva A. I., Konovalov A. I., Reznik V. S. and others.* // DAN, 2004, V. 394, p. 127-129.
3. *Zhigacheva I. V., Fatcullina L. D. Burlakova E.B., Shugaev A. I. and others.* // Biological membrane, 2008, V. 25, №2, P. 128-134.
4. *Rizkina I.S., Murtazina L. I., Kiselyov J. V., Konovalov A.I.* // "Property of supramolecular nanoassociates, formed in aqueous solutions low and ultra-low concentrations of biologically active substance", DAN, 2009, V. 428, № 4, p.487-491

ВЗАЄМОДІЯ БІСФОСФОНАТІВ ТА ВІТАМІНУ D_3 В РЕГУЛЯЦІЇ МІНЕРАЛЬНОГО ОБМІНУ ЗА АЛІМЕНТАРНОГО ОСТЕОПОРОЗУ

Апуховська Л.І., Комісаренко С.В., Рясний В.М., Шиманський І.О., Калашніков А.В., Великий М.М.

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, України
e-mail: apukhoska@biochem.kiev.ua

В останні роки в терапії різних форм остеопорозу використовують бісфосфонати, оскільки вони мають високу специфічність по відношенню до клітин кісткової тканини: індукують апоптозу клітин, інгібують функціональну активність остеокластів, АТР-залежних внутрішньо клітинних процесів, ензимів мевалонатного шляху, діють як інгібітори резорбції кісткової тканини, зменшуючи ризик переломів кісток на 50-80%. Ефективність бісфосфонатів у лікуванні патологій кісткової тканини особливо проявляється у їх поєднанні з регуляторами структурно-функціонального стану кісткової тканини – вітаміном D_3 й кальцієм. Разом з тим, функціональна активність бісфосфонатів значною мірою визначається їх хімічною структурою.

Мета дослідження полягала у вивченні впливу різних форм бісфосфонатів – динатрієвої солі метиленбісфонової кислоти (ДНМК) й алендронату на D3-вітамінний, мінеральний обмін та структурно-функціональний стан кісткової тканини за аліментарного остеопорозу.

Дослідження проводили на щурах лінії Wistar масою 100±5г. Модель аліментарного остеопорозу викликали шляхом утримання щурів на D-гіповітамінозному раціоні протягом 30 діб. Рівень кальцію, неорганічного фосфору, активність лужної фосфатази та її ізоформ у сироватці крові, визначали за допомогою біо-тест наборів (ЛАХЕМА, Чехія). Вміст 25OHD3 у сироватці крові та активність вітамін D3 25-гідроксилаз у гепатоциах визначали методом радіоконкурентного зв'язування після екстракції 25OHD3 сумішшю органічних розчинників та хроматографічного розділення на колонках з окисом алюмінію та LH-20. Гістологічні дослідження кісткової тканини проводили на зрізах забарвлених гематоксиліном Бомера та еозином.

Розвиток остеопорозу підтверджено остеометричними, гістоморфологічними змінами структурної організації епіфізарного хряща, великогомілкової кістки та порушеннями мінерального обміну у цій тканині (зниження зольності, вмісту кальцію і фосфору у золі порівняно із показниками контрольних тварин).

Показано, що за аліментарного остеопорозу суттєво (майже в 3 рази) знижується рівень 25-гідроксихолекальциферолу ($25OHD_3$) в сироватці крові, за вмістом якого діагностується ступінь забезпеченості організму вітаміном D_3. Стан D-гіповітамінозу обумовлює зниження забезпеченості організму кальцієм, за рахунок його біологічно активної ультрафільтрувальної фракції, та неорганічним фосфором. Одночасно зростає активність лужної фосфатази та її ізоензимів в сироватці крові. У структурі тканини стегнової та великогомілкової кісток щурів спостерігається стоншення шару компактної тканини, порушення формування остеонів, вставних пластинок та внутрішніх оточуючих кісткових пластинок. У епіфізарному хрящі кісток виявлено потовщення переважно за рахунок зони гіпертрофованих хрящових клітин та сповільнення процесу вростання судин, що в сукупності свідчить про гальмування остеогенезу.

З метою встановлення порівняльної ефективності різних форм бісфосфонатів, вивчали вплив ДНМК та алендронату на вищеназвані процеси. Комплексний препарат „Мебівід" (комплекс вітаміну D_3, кальцію карбонату та бісфосфонату – динатрієвої солі метиленбісфосфонової кислоти), за його введення щурам з аліментарним остеопорозом, нормалізує структурно-функціональний стан кісткової тканини, усуває порушення обміну вітаміну D_3 і мінерального обміну, що свідчить про високу специфічну ефективність препарату в попередженні остеопорозу. В той же час введення алендронату на тлі холекальциферолу не змінює вміст мінеральних компонентів у сироватці крові, що підтверджується даними змін активності лужної фосфатази та її ізоформ, які є біомаркером стану кісткової тканини. Більш виражений нормалізуючий ефект на активність лужної фосфатази за рахунок її кісткового ізоензиму відбувається при використанні комбінації вітаміну D_3 із ДНМК порівняно із комплексом вітаміну D_3 з алендронатом. Ці результати підтверджуються даними остеометричних і гістоморфологічних показників епіфізарного хряща та компактної кісткової тканини. У тварин, які отримували на тлі вітаміну D_3 різні форми бісфосфонатів, більш виражено зменшення висоти зони гіпертрофованих клітин, активація вростання судин в епіфізарний хрящ, перебудова компактної кісткової тканини та нормалізація її структурно-функціональної організації при використанні ДНМК порівняно із алендронатом, що може бути наслідком різного їх впливу на обмін вітаміну D_3.

Введення ДНМК призводить до зростання $25OHD_3$ у сироватці крові на 24%, а алендронату до його зниження на 11% порівняно з групою, яка на тлі остеопорозу отримувала лише вітамін D_3. Це є наслідком різного впливу досліджуваних бісфосфонатів на активність вітамін D_3 25-гідроксилазних ензимів: їх активація ДНМК й інгібування алендронатом.

Таким чином, отримані результати свідчать про перевагу використання комбінації вітаміну D3 та динатрієвої солі метиленбісфонової кислоти порівняно з алендронатом у лікуванні остеопорозу.

INTERACTION OF BISPHOSPHONATES AND VITAMIN D_3 IN REGULATION OF MINERAL METABOLISM IN NUTRITIONAL OSTEOPOROSIS

Apukhovska L.I., Komisarenko S.V., Riasniy V.M., Shymanskyy I.O., Kalashnikov A.V., Veliky M.M.

O.V. Palladin Institute of biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: apukhoska@biochem.kiev.ua

In recent years the treatment of various forms of osteoporosis are based on using bisphosphonates as they were previously shown to have high specificity in relation to bone cells. Bisphosphonates are known to induce apoptosis, inhibit osteoclast functional activity, downregulate the ATP-dependent intracellular processes and enzymes of mevalonate pathway. These compounds are also able to reduce the risk of bone fractures by 50-80%, acting as inhibitors of bone resorption. Effectiveness of bisphosphonates in the treatment of bone pathologies is much better in combination with vitamin D_3 and calcium, which are known regulators of bone tissue structural and functional state. However, the functional activity of bisphosphonates is highly dependent on their chemical structure. The study was undertaken to evaluate the effect of different forms of bisphosphonates - metylenbisfonic acid disodium salt (MDS) and alendronate - on vitamin D_3 availability, mineral metabolism and structural-functional state of bone tissue in nutritional osteoporosis.

All experiments were performed on female Wistar rats with body weight 100±5g. The nutritional osteoporosis was induced by keeping animals at the vitamin D deficient diet for 30 days. The levels of calcium and inorganic phosphorus, activities of alkaline phosphatase and its isoforms in blood serum were assayed using the Bio-test kits (LAHEMA, Czech Republic). The 25OHD3 content in blood serum and the activity of vitamin D3 25-hydroxylases in hepatocytes were measured by radio competitive binding following 25OHD3 extraction with a mixture of organic solvents and chromatographic separation on columns of alumina and LH-20. Histological study of bone tissue were determined on sections stained with Bomer hematoxylin and eosin.

The development of osteoporosis was confirmed by osteometric and histomorphological changes in the structural organization of epiphyseal cartilage and the tibia as well as by impairments of mineral metabolism in these tissues (ash contents, their calcium and phosphorus levels markedly decreased as compared with control animals).

The level of 25-hydroxycholecalciferol ($25OHD_3$) in serum, that reflects the body's supply of vitamin D_3, was shown to be significantly (by 3 times) reduced in nutritional osteoporosis. D-hypovitaminosis contributes to lowering of calcium content, most likely due to its biologically active ultrafiltrating fraction, as well as inorganic phosphorus in serum. At the same time the increased activity of alkaline phosphatase and its isoenzymes in serum were seen. The structure of rat femoral and tibial tissues exhibits the thinning of compact tissue layer, the impairment of formation of osteons and lamellae. It was revealed the thickening of bone epiphyseal cartilage, preferentially occurring due to the zone of hypertrophied cartilage cells. In addition, the retarded process of vessels formation in the bone was observed. Collectively, these data suggest inhibition of osteogenesis.

To compare the efficiency of different forms of bisphosphonates, we studied the effects of MDS and alendronate on the aforementioned processes. Administration of "Mebivid" (combined preparation of vitamin D_3, calcium carbonate and bisphosphonate - metylenbisfonic acid disodium salt) to rats with nutritional osteoporosis led to improvement of the the structural and functional state of bone tissue and attenuated abnormalities of both vitamin D_3 and mineral metabolism. It suggests a high specific efficacy of the preparation in preventing osteoporosis. Nevertheless, alendronate treatment in combination with cholecalciferol had no effect on the content of mineral components in the serum, as it is confirmed by the changes in the activity of alkaline phosphatase and its isoforms known as biomarkers of bone tissue state. Unlike the combination of vitamin D_3 and alendronate, more pronounced normalizing effect on the activity of alkaline phosphatase, mainly due to its bone isoenzymes, occured when a combination of vitamin D_3 and MDS was used. These results are in agreement with the data obtained from osteometric and histomorphological studies of epiphyseal cartilage and compact tissue structures. In contrary to alendronate, animals treated with MDS in combination with vitamin D_3 revealed more profound decrease in the size of hypertrophied cells zone that was accompanied by elevation of the amount of ingrown vessels in the epiphyseal cartilage, compact bone tissue reconstruction and normalization of its structural and functional features. The different effects of bisphosphonates could be attributed to the different efficiency of their action on the vitamin D_3 metabolism.

MDS treatment resulted in 24% elevation of $25OHD_3$ in serum, whereas alendronate was twice less effective compared with the group of animals with osteoporosis that received vitamin D_3 only. This could be explained by different influences of various bisphosphonates on the activity of vitamin D_3 25-hydroxylases, which are known to be activated by MDS and inhibited by alendronate.

In summary, our findings have shown the advantage of using a combination of vitamin D_3 with metylenbisfonic acid disodium salt compared with alendronate in treating osteoporosis.

АДРЕНОКОРТИКОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ РОЗЧИННОЇ ФОРМИ о,п´-ДДД (ХЛОДИТАНУ) ПРИ ВНУТРІШНЬОВЕННОМУ ВВЕДЕННІ СОБАКАМ

Бальон Я.Г., Сімуров О.В.

Державна установа "Інститут ендокринології та обміну речовин ім.В.П.Комісаренка НАМН України", Київ, Україна
e-mail: alsimur@rambler.ru

На сьогодні актуальною є проблема радикального лікування патологій надниркових залоз з приводу усунення гіперфункції гормонів або позбавлення хворого від пухлинного процесу. В цих випадках найчастіше використовують адреналектомію і хлодитанотерапію. Причому для досягнення стійкого клінічного ефекту необхідно застосовувати хлодитан перорально протягом декількох місяців (максимальна добова доза 8-10 г), при багаторазовому курсі лікування. Використання високих доз препарату приводить до появи цілого ряду побічних ефектів. Слід зазначити, що при пероральному застосування хлодитан має невисоку біодоступність. Для підвищення його терапевтичної ефективності, зниження дозування та побічної дії запропонована парентеральна форма, яка не має світових аналогів. Показано, що внутрішньовенне трьохкратне введення 10 мл – (3 дні, через добу) 5 % розчину о,п´-ДДД в суміші розчинників (пропіленгліколь : етанол : N,N-диметилацетамід – 7:2:1) знижує вміст 11-гідроксикортикостероїдів (11-ГОКС) в плазмі крові собак майже в 3,5 рази. Перед введенням о,п´-ДДД проводили тест на функціональні резерви кори надниркових залоз шляхом стимуляції синтетичним 1-24-кортикотропіном (синактен-депо, Німеччина) внутрішньовенно у дозі 25 МО гіпофізарного АКТГ. На тлі введення синактену відбулося майже трьохкратне послаблення реакції кори надниркових залоз, яку оцінювали як за приростом концентрації 11-ГОКС в плазмі крові, так і за рівнем, досягнутим після гормональної стимуляції.

Отже під впливом розчину о,п´-ДДД відбувається не тільки глибоке пригнічення секреції кортикостероїдів, але й суттєво зменшуються функціональні резерви кори надниркових залоз. За умов внутрішньовенного введення хлодитану терапевтичний ефект досягається у 10-15 разів меншою кількістю, в порівнянні з пероральним застосуванням о,п´-ДДД, інгібітору на курс, що суттєво послаблює загальнотоксичні ефекти препарату. Зниження вмісту 11-ГОКС в плазмі крові собак спостерігалося і через 2 тижні після відміни введення препарату. Таким чином запропонований розчин о,п´-ДДД проявляє адренокортиколітичну активність і може бути рекомендований для подальших клінічних досліджень.

Література:

1.Патент № 54523 U, МПК А61К 9/08, 3/02; А61Р 5/00 опубл. 10.11.2010, Бюл. №21.
2.*Тронько М.Д., І.В.Комісаренко, Я.Г.Бальон та ін.*// Журн.АМН України.–2010.– 16, №2.–С.271-286.

ADRENOCORTICOLYTIC ACTIVITY OF SOLUBLE FORM OF o,p'-DDD (CHLODITANE) AT INTRAVENOUS INJECTION TO THE DOGS

Balyon Ya. G., Simurov O.V.

State Institution "V.P.Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism,l Acad. Med. Sci. Ukraine", Kyiv, Ukraine
e-mail: alsimur@rambler.ru

Today the problem of radical treatment of pathologies of glands is actual to remove the hormones' hyperfunction or tumorous process from patient. The adrenalectomy and the chloditanetherapy are used more frequently in these cases. Thus for achievement of persistent clinical effect, it is necessary to apply chloditane peroral during a few months (maximal day's is dose 8-10 g) with the frequent courses of treatment. Use of high doses of the preparation results in a number of side effects. It should be noted that, at peroral application, chloditane has low bioavailability. For increasing of its therapeutic efficiency, declining dosage and side effects parenterally form was offered which does not have analogues. It is established that triple intravenous injection of 10 mL - (3 days, every other day) of 5% solution of o,p'-DDD in solution of propyleneglycole : ethanol : N,N-dymethylacetamide – 7:2:1 reduces level of 11-hydrocorticosteroids (11-HCS) in plasma of dog blood almost in 3,5 times. Before introduction of o,p'-DDD, a test on functional reserve of adrenal cortex was conducted by 1-24-corticotropine synthetic stimulation (sinacten-depot, Germany) intravenously in a dose of 25 MO hypophysic ASTN. Almost triple reduction of reaction of adrenal cortex tooks place after introduction, which was estimated on both the basis the increase of concentration of 11-GOKS in plasma of blood and the level attained after hormonal stimulation.

Therefore, under action of solution of o,p'-DDD not only deep oppression of secretion of corticosteroids tooks place, but also functional reserves of adrenal cortex substantially diminish. Under condition of intravenous injection of chloditane, therapeutic effect is achieved by 10-15 times less dose, as compared to peroral application of o,p'-DDD inhibitor, that substantially decreases common toxic effects of the preparation. Decreasing 11-GOKS level in plasma of dog blood was observed during 2 weeks after abolition of the preparation. Therefore, the offered solution of o,p'-DDD shows adrenocorticolitic activity and can be recommended for subsequentclinical research.

References:

1.Patent ¹ 54523 U, MPK A61K 9/08, 3/02; A61P 5/00 Publ. 10.11.2010, Bul. ¹ 21.
2.*Tron'ko M.D., I.V. Komisarenko, Ya. G. Balyon and others* // Journal. AMN Ukraine. – 2010. – V.16 ¹2. – P. 271-286.

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА В ЛЕЧЕНИИ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

[1] Беляева О.А., [2] Нешта В.В., [3] Уланович Л.И., [4] Голуб А.А.

[1]Национальная медицинская академия последипломного образования им. П.Л. Шупика, Киев, Украина
[2]Отделенческая клиническая больница станции «Запорожье-2», Запорожье, Украина
[3]Киевская городская клиническая больница №6, Киев, Украина
[4]Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина
e-mail: agolub@univ.kiev.ua

Проблема лечения гнойно-воспалительных осложнений остаётся актуальной. Всемирная организация здравоохранения объявила 2011 год годом борьбы с антибиотикорезистентностью микроорганизмов. Несмотря на достижении в диагностики и лечения хирургической инфекции, широкого арсенала антимикробных и антисептических средств, разных форм препаратов которые применяются в лечения ран в зависимости от фаз раневого процесса, улучшения результатов лечения этой категории больных не наблюдается. В связи с чем, перспективным является создание новой группы препаратов нового поколения - ферментов и аппликационных сорбентов, механизм действия основан на синергическом воздействии с литическими ферментами эндогенной раневой аутофлоры. Нами был синтезирован новый аппликационный сорбент Сертасил - иммобилизированный на пирогенном высокодисперсном кремнеземе протеолитический фермент серратиопептидаза [1,2].

Цель исследования. Улучшение результатов лечения хирургической инфекции за счет применение нового аппликационного сорбента «Сертасил».

В основу клинических исследований положен опыт лечения 89 больных с гнойными процессами различной локализации. У этих больных применили усовершенствованные схемы и методики лечения, с использованием аппликационных сорбентов. Применялись клинико-лабораторные, ультрасонографические, рентгенологические, цитоморфологические, бактериологические, иммунологические методы исследований.

Таблица: Клинические показатели течения раневого процесса в группах, (M ± т)

Группа больных	Клинические показатели					
	Купирование болевого синдрома	Нормализация температуры тела (сутки)	Очищения раны (сутки)	Появления грануляций (сутки)	Полная заживления (сутки)	Койка - день
Основная группа	2,15±0,18 p≤0,001	4,55±0,19 p≤0,001	2,64±0,15 p≤0,()01	3,84±0,12 p≤0,001	6,74±0,15 p=0,001	8,84±0,56 p≤0,001
Контрольная группа	5,07±0,16	7,45±0,21	8,2±0,18	1.0,9±0.28	17,94±0,56	18,7±0,58

При клиническом применение препарата Сертасил отмечается его высокая эффективность в отношении хирургической инфекции разнообразной локализации, о чем свидетельствует более быстрое очищение ран на 5,6 суток (p<0,05) и их заживление - на 11,2 суток быстрее, чем при применении «Гентаксана» (p<0,05). Препарат запатентован в странах Европы, США, Японии, Индии, Австралии и др.

Литература:

1. *Biliaieva O.A., Golub A.A., Neshta V.V.* Antimicrobial composition. International patent, PCT, publ. 15.01.2009, publ.N WO 2009/008851 A2, www.wipo.int/pctdb
2. *О.А. Беляєва, А.А. Голуб, В.В. Нешта.* Опыт диагностики и лечения кисты урахуса в практике хирурга с использованием аппликационных сорбентов» Вісник праць співробітників КМАПО. – 2007.
3. *О.О. Біляєва, О.А. Голуб, В.В. Нешта, В.В. Біляєв.* Ефективність нового аплікаційного сорбентного препарату «сертасил» в лікуванні хірургічної інфекції // Український Журнал Хірургії. - № 3. - 2009.- С. 7 – 10..

BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN THE TREATMENT OF SURGICAL INFECTIONS

[1] Belyaeva O.A., [2] Neshta V.V., [3] Ulanovych L.I., [4] Golub A.A.

[1]Shupik National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv, Ukraine
[2]Divisional Clinical Hospital of Zaporizhia-2 Railway Station, Zaporozhe, Ukraine
[3] Kyiv Municipal Clinical Hospital No6 , Kyiv, Ukraine
[4] Kyiv Shevchenko National University, Kyiv, Ukraine
e-mail: agolub@univ.kiev.ua

The problem of treatment of suppurative - inflammatory complications remains relevant. World Health Organization declared in 2011 year against antibiotic resistance microorganisms. Despite advances in diagnosis and treatment of surgical infections, a vast arsenal of antimicrobial and antiseptic agents, various forms of drugs that are used in treating wounds, depending on the phases of wound healing, improve clinical results of these patients is not observed. In this connection, it is promising to create a new group of preparations of a new generation - the enzymes and application sorbents, the mechanism of action is based on the synergistic effects of lytic enzymes endogenous wound autoflora. We have synthesized a new application sorbent Sertasil – which consists of proteolytic enzyme serrathiopeptidase immobilized on pyrogenic highly dispersive silica.

The purpose of study. Improving of results of treatment of a surgical infection due to application new application sorbent Sertasil.

The basis of clinical studies is based on the experience of treating 89 patients with purulent processes of various localization. For patients was used a sophisticated scheme and the treatment with application sorbents. There were used clinical and laboratory, ultrasonic, radiological, cytomorphological, bacteriological, immunological methods of study.

In the study group was used "SertaSil" in the control group – “Gentaxane”.

Table. Clinical indicators of wound healing process in groups (M ± m)

A group of patients	Clinical indicators					
	Relief of pain	Normalization of body temperature (days)	Wound cleansing (days)	Appearance of granulation (days)	Complete healing (days)	Bed - day
The study group	2,15±0,18 p≤0,001	4,55±0,19 p≤0,001	2,64±0,15 p≤0,()01	3,84±0,12 p≤0,001	6,74±0,15 p=0,001	8,84±0,56 p≤0,001
Control group	5,07±0,16	7,45±0,21	8,2±0,18	1.0,9±0.28	17,94±0,56	18,7±0,58

At a clinical application of a preparation "SertaSil" is marked its high efficiency concerning a surgical infection of various localization to what faster clarification of wounds - for 5,6 days (p ≤0,05) testifies and their healing - for 11,2 days is faster, than at application "Gentaxane” (p ≤0,05).

The drug is patented in Europe, USA, Japan, India, Australia, etc..

References:

1. *Biliaieva O.O., Golub A.A., Neshta V.V.* Antimicrobial composition. International patent, PCT, publ. 15.01.2009, publ.N WO 2009/008851 A2, www.wipo.int/pctdb
2. *Biliaieva O.O., Golub A.A., Neshta V.V..* Experience of Diagnostics and Treatment Urachus’ Cyst in Surgeon Practice with Aplication Sorbents Use. Herald of KMAPE’ Employee Researches. – 2007.
3. *O.O.Biliayeva, A.A.Golub, V.V.Neshta, V.V.Biliayev.* Effectiveness of new applicational sorbent preparation Sertasil in treatment of surgical infection. Ukrainian Journal of Surgery.- 2009.- N 3, P. 7 – 10.

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИПРОБИОТИКА «СИМБИТЕР® ФОРТЕ» НА СЕКРЕЦИЮ КИСЛОТЫ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ СЛИЗИСТОГО БАРЬЕРА В ЖЕЛУДКЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОЙ БЛОКАДЫ H^+-K^+-АТФазы

[1] Береговая Т.В., [1] Абдулахад К.Ф., [1]Цирюк Е.И., [1]Прибытько И.Ю., [2]Непорада К.С.

[1]Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина
e-mail: tberegova@univ.kiev.ua
[2]Украинская медицинская стоматологическая академия, Полтава, Украина

Ранее нами было показано, что длительное (28 дней) введение крысам блокатора ключевого фермента синтеза соляной кислоты в желудке омепразола приводит к нарушению структурно-функционального состояния слизистой оболочки желудка (СОЖ), что проявляется в повышеннном катаболизме коллагеновых и неколлагеновых белков соединительной ткани и развитии гиперплазии в слизистой оболочке, в результате чего после отмены омепразола возрастает дебит кислоты базальной желудочной секреции. Также установлено, что длительное угнетение желудочной секреции приводит к развитию дисбактериоза в желудке. Применение мультипробиотика "Симбитер® ацидофильный" концентрированный на фоне 28 дневного введения омепразола препятствовало развитию дисбактериоза и существенно уменьшало негативные последствия гипоацидности. Учитывая небольшой срок хранения мультипробиотика "Симбитер® ацидофильный" концентрированный (2 месяца), был создан мультипробиотик "Симбитер® форте", который не отличался по качественному и количественному составу от "Симбитера® ацидофильного" концентрированного, однако имел в дважды больше срок хранения.

В связи с этим целью работы было изучение влияния мультипробиотика "Симбитер® форте" на секрецию кислдоты и функционирование слизистого барьера желудка крыс в условиях длительной блокады H^+-K^+-АТФазы.

Эксперименты выполнены на 89-ти крысах-самцах массой 180-220 г, которые были разделены на 3 группы. Крысы I группы, которым в течении 28 дней внутрибрюшинно (в/б) и перорально (п/о) вводили по 0,2 мл воды для инъекций, служили контролем. Крысам II группы в течении 28 дней один раз в сутки в/б вводили омепразол (ОМ) в дозе 14 мг/кг, растворенный в 0,2 мл воды для инъекций. Крысам III группы одновременно с ОМ п/о в дозе 0,14 мл/кг вводили мультипробиотик "Симбитер® форте" (ООО-фирма "О.Д. Пролисок"). Через сутки после последнего введения воды (контрольная группа) либо препаратов (II и III группы) в условиях острого эксперимента у крыс, наркотизированных уретаном (1,15 г/кг, в/б), определяли уровень базальной секреции соляной кислоты методом перфузии изолированного желудка по Гхошу и Шильду. Кислотность желудочного сока определяли в 10-ти минутных пробах перфузата путем его титрования 0,01 н раствором NaOH. В СОЖ определяли содержание свободных оксипролина, фукозы и гексуроновых кислот.

Через сутки после последнего введения омепразола дебит кислоты базальной желудочной секреции возрастал на 305,8 % ($p<0,001$). Длительная гипоацидность желудочного сока, вызванная 28 дневным введением омепразола, приводила к увеличению содержания свободного оксипролина в СОЖ на 87,0% ($p<0,001$), что свидетельствует о повышенном катаболизме коллагеновых белков слизистого геля желудка. Также в СОЖ на 94,4% ($p<0,001$) возрастало содержание гексуроновых кислот, которые являются мономерами дисахаридных единиц гликозаминогликанов, и на 107,0% ($p<0,001$) возрастало содержание фукозы, которая входит в состав нейтральных гликопротеинов. Т.е., длительная гипоацидность не только разрушает слизистый барьер и нарушает резистентность слизистой, но и понижает интенсивность регенеративных процессов. После одновременного введения в течении 28 дней омепразола и мультипробиотика "Симбитер® форте" дебит кислоты базальной желудочной секреции был на 41,1% ($p<0,05$) меньше дебита кислоты базальной желудочной секреции у крыс, которым в течении 28 дней вводили только омепразол. Одновременное введение омепразола и мультипробиотика "Симбитер® форте" приводило к уменьшению содержания свободного оксипролина на 23,5% ($p<0,001$), гексуроновых кислот на 25,1% ($p<0,01$), фукозы на 38,5% ($p<0,05$) по отношению к соответственным показателям в СОЖ крыс, получавших только омепразол.

Таким образом мы подтвердили ранее полученные данные о том, что длительное угнетение секреции соляной кислоты приводит к развитию патологических изменений в желудке. Одновременное введение мультипробиотика "Симбитер® форте" и омепразола в течении 28 дней не только способствовало снижению кислотности желудочного сока после отмены омепразола, но и существенно уменьшало коллагенолитические процессы, деполимеризацию фукопротеинов соединительной ткани и протективных белков.

Сделан вывод о том, что мультипробиотики группы «Симбитер» являются эффективными средствами профилактики структурно-функциональных изменений в желудке, вызванных длительной гипоацидностью.

THE INFLUENCE OF MULTIPROBIOTIC "SYMBITER® FORTE" ON ACID SECRETION AND FUNCTIONING OF MUCOSAL BARRIER IN STOMACH OF RATS IN CONDITIONS OF LONG-TERM INHIBITION OF H^+-K^+-ATPase

[1]Beregova T.V., [1]Abdulahad K.F., [1]Tsyryuk O.I., [1]Prybytko I.Yu., [2]Neporada K.S.

[1]Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
e-mail: tberegova@univ.kiev.ua
[2]Higher medical educational institution of Ukraine "Ukrainian medical stomatological academy", Poltava, Ukraine

We have previously shown that long-term (28 days) injection to the rats of blocker of a key enzyme of the synthesis of hydrochloric acid in the stomach of omeprazole leads to disruption of the structural and functional state of the gastric mucosa, which manifests itself in increase of catabolism of collagenous and non-collagenous proteins of connective tissue and the development of hyperplasia in the mucosa, resulting in after discontinuation of omeprazole increased output of basal acid gastric secretion. Also it was found that prolonged inhibition of gastric secretion leads to the development of dysbiosis in the stomach. Application of multiprobiotic "Symbiter ® acidophilic" concentrated on the background of 28 days of omeprazole administration prevented the development of dysbiosis and significantly reduced the negative effects of hypoacidity. Taking into account a short term storage of multiprobiotic "Symbiter ® acidophilic" concentrated (2 months), multiprobiotic "Symbiter ® forte" has been created which did not differ in qualitative and quantitative composition from "Symbiter ® acidophilic" concentrated, however, had more than twice the term storage.

In connection with this the aim of our work was to study the effect of multiprobiotic "Symbiter ® forte" on the gastric acid secretion and functioning of mucosal barrier in the stomach of rats under prolonged blockade of H +-K +-ATPase.

Experiments were performed on 89 male rats weighting 180-220 g which were divided into 3 groups. Rats in group I, who for 28 days intraperitoneally (i.p.) and orally were injected 0.2 ml of water for injection, served as controls. To the rats in group II within 28 days once a day was introduced i.p. omeprazole in dose of 14 mg / kg, dissolved in 0.2 ml of water for injection. To the rats in group III together with omeprazole orally was injected multiprobiotic "Symbiter ® forte" in dose of 0.14 ml / kg (Limited Liability Company " OD Prolisok). One day after the last injection of water (control group) or drugs (II and III groups) in an acute experiment in rats anesthetized with urethane (1.15 g / kg i.p.), we determined the level of basal gastric acid secretion by the isolated perfusion of the stomach by Ghosh and Schild. Gastric acidity was determined in the 10-minute samples of perfusate through its titration 0.01 N solution of NaOH. In the homogenate of the gastric mucosa the content of free hydroxyproline, fucose and hexuronic acids were determined.

One day after the last administration of omeprazole the output of basal acid gastric secretion was increased by 305,8% ($p < 0,001$). Prolonged hypoacidity of gastric juice caused by the 28-day administration of omeprazole leads to an increase of free hydroxyproline in gastric mucosa by 87,0% ($p < 0,001$) that indicates on increased catabolism of collagenous proteins of the mucous gel of the stomach. Also in the the homogenate of the gastric mucosa the content of hexcuronic acid, which are monomers disaccharide units of glycosaminoglycans, increased by 94,4% ($p < 0,001$). The content of fucose, which is a part of neutral glycoproteins, was increased by 107,0% ($p < 0,001$). Thus long-term hypoacidity not only destroys the mucosal barrier and violates the resistance of the mucosa, but also lowers the intensity of the regenerative processes. After co-administration within 28 days of omeprazole and multiprobiotic "Symbiter ® forte" the output of basal acid gastric secretion was 41,1% ($p < 0,05$) lower the output of basal acid gastric secretion in rats within 28 days of omeprazole was administered only. Concomitant administration of omeprazole and multiprobiotic "Symbiter ® forte" led to decrease of free hydroxyproline by 23,5% ($p < 0,001$), hexuronic acids by 25,1% ($p < 0,01$), fucose by 38,5% ($p < 0,05$) relatively to rats treated with only omeprazole.

Thus we have confirmed previous findings that prolonged inhibition of secretion of hydrochloric acid leads to the development of pathological changes in the stomach. Simultaneous administration of multiprobiotic "Symbiter ® forte" and omeprazole during 28 days not only reduce gastric acidity after discontinuation of omeprazole, but also significantly reduced the collagenolytic processes, depolymerization of fucoproteins of connective tissue and protective proteins.

We concluded that multiprobiotics of group "Symbiter" are an effective means of prophylactic of structural and functional changes in the stomach caused by long-term hypoacidity.

ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ БІЛКОВИХ ФРАКЦІЙ ПЕЧІНКИ ЗА УМОВ ТРИВАЛОЇ ГІПОХЛОРГІДІЇ

Берник О.О., Савчук О.М., Дворщенко К.О., Берегова Т.В., Остапченко Л.І.

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail: ksenia_bernyk@list.ru

На сьогодні доведено, що тривале використання інгібіторів протонної помпи парієтальних клітин шлунка, зокрема омепразолу, призводить до гіпергастринемії та розвитку шлункової атрофії і метаплазії, що уможливлює виразкоутворення та розвиток пухлин. Іншим наслідком тривалої гіпохроргідрії є розмноження патогенної мікрофлори в шлунково-кишковому тракті, що може підсилювати розвиток гіпоацидних гастритів та викликати дисбактеріози.

Запалення, зокрема гастрит, супроводжується активацією протеосинтетичної функції печінки. Спостерігається гіперпротеїнемія внаслідок зібльшення γ-глобулінової фракції, до якої належить більшість білків гострої фази запалення, та підвишення рівня імуноглобулінів.

Таким чином, метою роботи було оцінити електрофоретичний спектр білків печінки щурів за умов тривалого пригнічення кислотної секреції шлунка омепразолом та при корекції мультипробіотиком «Симбітер® ацидофільний»

Матеріали та методи. Досліди проводили на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях масою 160-200 г. Контрольну групу склали щури, які протягом 28 днів отримували 0,2 мл води для ін'єкцій. Другу групу склали щури, які протягом 28 днів отримували внутрішньоочеревинно «Омез®» виробництва Dr. Reddy's Laboratories (Індія), діючою речовиною якого є омепразол. «Омез» вводили протягом 28 днів в дозі 14 мг/кг один раз на добу, розчиняючи в 0,2 мл води для ін'єкцій. Щури третьої групи протягом 28 днів одночасно з введенням омепразолу отримували мультипробіотик «Симбітер® ацидофільний» виробництва ТОВ «О.Д.Пролісок» в дозі 0,14 мл/кг per os. Фракційний склад білків печінки визначили методом диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі за метолом Лемлі. Статистичну обробку результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики.

Результати. В результаті диск-електрофорезу в ПААГ білки печінки розділились на 7 фракцій. Виявлено кількісні зміни у співвідношенні білкових фракцій в досліджуваних групах тварин: за умов введення омепразолу та при корекції мультипробіотиком «Симбітер® ацидофільний».

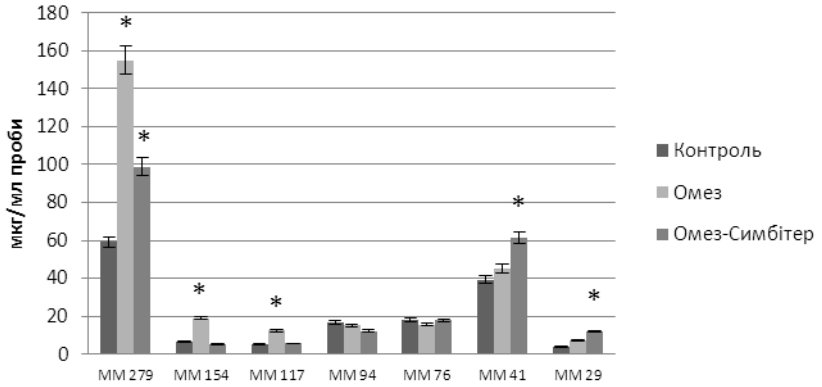


Рис.1. Розподіл білкових фракцій гомогенату гепатоцитів за умов розвитку гіпохлоргідрії та при корекцій мультипробіотиком «Симбітер® ацидофільний» (n=10); $p \leq 0,05$, по відношенню до контролю

За умов гіпергастринемії спостерігається достовірне збільшення всіх фракцій високомолекулярних білків. Відтак, фракції глобулінів з ММ = 279 кДа підвищималась в 2,6 раза, ММ = 154 кДа – в 3 рази, ММ = 117 кДа в 2,5 раза. Півищений синтез цих білків у печінці може свідчити про розвиток локального запалення. Введення мультипробіотика призводило до зниження (ММ = 279 кДа в 1,47 раза) та відновлення (ММ = 154 кДа та ММ = 117 кДа) рівня цих високомолекулярних протеїнів до контрольних значень, а отже і нормалізації білок-синтетичної функції печінки.

Статистично достовірних змін у постальбумінових фракціях (ММ ~30 -40 кДа) за умов тривалої гіпохлоргідрії не зафіксовано. Після введення мультипробіотика спостерігалося підвищення постальбумінових фракцій з ММ = 41 кДа і М = 29 кДа в 1,6 та 2,3 разів відповідно. Такі зміни можна пояснити посиленим синтезом адаптерних білків цих фракцій, які можуть виконувати протекторну роль.

В інших фракціях достовірних змін виявити не вдалось.

Висновки. За умов тривалої шлункової гіпохлоргідрії підвищення рівня високомолекулярних білків у печінці, може вказувати розвиток запалення. Корекція мультипробіотиком «Симбітер® ацидофільний» призвела до зниження глобулінових фракцій, та підвищення постальбумінових. Таким чином, використання препарату «Симбітер® ацидофільний» може стати ефективним засобом профілактики захворювань шлунково-кишового тракту, які викликані зниженою секрецією соляної кислоти.

ELECTOPHORETICAL ANALYSIS OF LIVER PROTEINS UPON PROLONGED HYPOACIDITY

Bernyk O. O., Savchuk O. M., Dvorchenko K.O., Beregova T.V., Ostapchenko L.I.

ESC «Institute of biology» Taras Shevchenko national university of Kyiv, Ukraine
e-mail: ksenia bernyk@list.ru

Over the past years it was shown for the parietal stomach cells that prolonged use of the proton pump inhibitors, e.g. omeprazole, can cause hypergastronemy and stomach atrophy and metaplasia. These pathologies, in their turn, can be per-requisites for the ulseration and tumor development. Another consequence of prolonged hypoacidity is the propagation of pathogenic microflora that increases development of the hypoacetic gastritis and dysbacteriosis.

Inflammation, e.g. during gastritis, is followed by the activation of protein synthesis in liver (hyperproteinemia). Hyperproteinemia is mostly caused by the increase in γ-globulin fraction, composed by the proteins of acute inflammation phase, and in immunoglobulin levels.

The aim of our study was to estimate the electrophoretical spectrum of rat liver proteins under the prolonged inhibition of acid secretion in stomach with omeprazole and “Symbiter® acidophilic” treatment.

Materials and methods. White viripotent male-rats were used for all the experiments. The control group of animals received the injections with 0,2ml of dH2O for 28 days. The first experimental group received the intraabdominal injections with “Omez®” (Dr. Reddy’s Laboratories, India), omeprazole-containing drug. “Omez®” was administrated every day for 28 days in amount 14mg/kg (diluted in 0,2ml dH2O). The second experimental group together with omeprazole received multiprobiotic “Symbiter® acidophilic” („OD Prolisok“ Ltd.) per os, in concentration 0,14 ml/kg. The composition of liver proteins was determined by the disc-electrophoresis in polyacrilamide gel (PAAG) according to Laemli protocol with modifications. Statistical analysis was done by general methods of variational statistics.

Results. After dics-electrophoresis in PAAG liver proteins were separated on 7 fractions. The amount of proteins in certain fractions was changed after omeprasole treatment and “Symbiter® acidophilic” correction.

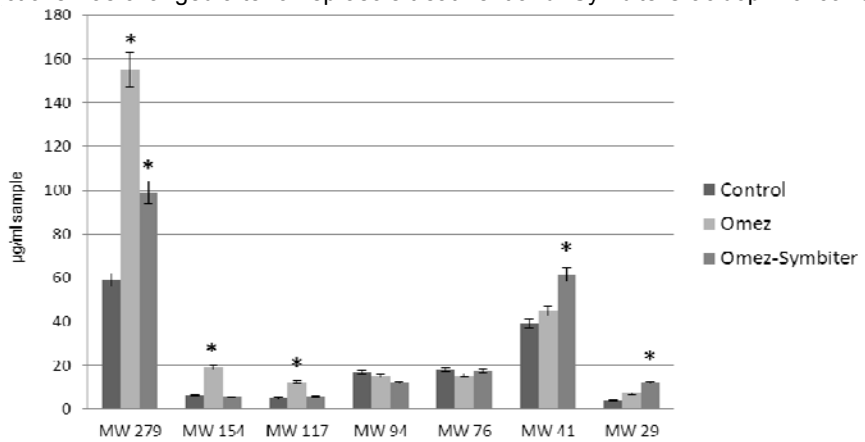


Fig.1. Distribution of protein fractions from homogenated hepatocytes under hypoacedic conditions and after correction with multiprobiotic “Symbiter® acidophilic” (n=10); $p \leq 0,05$, in comparison to control

Upon hypoacidity we observed a statistically significant increase in all the fractions of high molecular weight proteins. The globulin fraction with MW=279 kDa had a 2,6-fold increase, MW=154 kDa – a 3-fold increase and MW=117 kDa – a 2,5-fold increase. Elevated synthesis of these proteins suggests a local development of the inflammation. Introduction of multiprobiotic led to decrease of MW=279 kDa fraction in 1,47 folds and restoration of MW=154 kDa and MW=117 kDa fractions to control levels. This data suggests that protein synthesis in liver restored to normal levels after treatment with multiprobiotic.

We did not observe any statistically significant changes in the post-albumin fractions (MW ~30 -40 kDa) under prolonged hypoacidity conditions. After the multiprobiotic administration amount of post-albumin fractions with MW=41 kDa and MW=29 kDa increased by 1,6 and 2,3 folds respectively. These changes can be explained by the overproduction of the adaptor proteins, which can have a protective role, in these fractions.

In the other protein fractions no significant changes were detected.

Conclusions. Elevated levels of the high molecular weight proteins in liver under prolonged hypoacidity conditions can point on the inflammation development. Correction with “Symbiter® acidophilic” led to decrease in the globulin fractions and to increase in the post-albumin fractions. We suggest that the use of “Symbiter® acidophilic”can be a prophylaxis measure for the gastro-intestinal diseases, caused by the low acid secretion.

ПЕПТИДНЫЙ СОСТАВ КОЖИ КРЫС ПРИ ХОЛОДОВОЙ ТРАВМЕ

Богатырева Е.О., Беспалова И.Г., Гальченко С.Е., Сандомирский Б.П.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Оптимизация процесса лечения термических травм кожи по-прежнему остается актуальной задачей. Для решения этой задачи необходимо углубление знаний о механизмах регулирования процесса репаративной регенерации. В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что в этом процессе значительную роль играют регуляторные пептиды.

Ранее нами было показано, что экстракт криоконсервированных фрагментов селезенки свиней (ЭСС) оказывают положительное влияние на протекание репарационной регенерации при различных патологических состояниях.

Целью данной работы было изучение пептидного состава кожи крыс при холодовой травме и влияние на него введения животным ЭСС.

ЭСС получали из криоконсервированных фрагментов селезенки свиней, а экстракты кожи крыс из измельченных участков, прилегающих к зоне травмы, путем их инкубирования в физиологическом растворе 60 мин. Полученный экстракт фильтровали и освобождали от термолабильных белков.

В работе были использованы самцы беспородных крыс массой 190-220 г. Холодовые травмы наносились на наружную поверхность бедра медным аппликатором диаметром 10 мм, охлажденным в жидком азоте, время экспозиции – 60 сек. ЭСС вводили внутрибрюшинно по 1мл один раз в сутки на протяжении всего эксперимента (концентрация пептидов 100 мкг/мл). Контрольным животным вводили по 1 мл физиологического раствора. Для определения молекулярно-массового распределения пептидов использовали метод высокоэффективной гельпроникающей хроматографии.

Хроматограмма экстракта нативной кожи крыс характеризуется 3-я пиками. Из них низкомолекулярными являются пики со средней м.м. пептидов 1438 и с м.м. 1087, относительная площадь которых составляет 17,870 и 26,663 %.

На 3 сут эксперимента различий в состоянии ран контрольной и экспериментальной групп животных не отмечалось. Хроматограмма экстракта кожи контрольных животных характеризуется 6 пиками, а при введении животным ЭСС наблюдается 8 пиков.

На 14 сут различия в состоянии и площади ран наиболее выражены. В контрольной группе холодовые раны по-прежнему гиперемированы, с островками фибринозного налета, местами сохраняется трудно отделяемый струп. При введении ЭСС поверхность раны представляет собой гладкую гранулирующую поверхность розового цвета.

На хроматограмме экстракта контрольных животных на 14 сут наблюдается 11 пиков. Наиболее интенсивный пик соответствовал фракции пептидов с м.м. 1600. При введении крысам ЭСС на хроматограмме регистрируется 6 пиков, при этом наиболее интенсивным также является пик, соответствующий пептидам с м.м. 1600.

На 21 и 28 сут наблюдается нормализация пептидного состава экстрактов, и она более выражена у животных, которым вводили ЭСС.

Таким образом, можно сделать вывод, что пептидный состав кожи крыс с холодовой травмой зависит от стадии раневого процесса, а введение животным ЭСС влияет на скорость заживления ран и молекулярно-массовое распределение пептидов в экстрактах.

PEPTIDE COMPOSITION OF RAT SKIN DURING FREEZING INJURY

Bogatyreva E.O., Bespalova I.G., Galchenko S.E., Sandomirsky B.P.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Optimization of the process of treating the skin heat injuries still poses an immediate problem. Its solution requires deepening of the knowledge on the mechanisms of regulating the process of reparative regeneration. The fact that regulatory peptides play a major part in this process raises no doubts nowadays.

Earlier we have shown that the extracts of the porcine cryopreserved spleen fragments (PSF) exercise a positive action upon occurrence of reparative regeneration during various pathological states.

The aim of the given research was to study the peptide composition of the rat skin during freezing injury and its susceptibility to the PSF injection to the animals.

The PSF were harvested from the cryopreserved porcine spleen fragments, while the rat skin extracts were collected from the blenderized areas, adjacent to the zone of the injury, by incubating them in a physiological saline for 60 min. The extracts thus obtained were filtered and thermolabile proteins were eliminated from them.

Male outbred rats with the body weights of 190-220 g were used in the experiments. Freezing injuries were inflicted to the outer surface of the hip with a copper applicator with a diameter of 10 mm, cooled in liquid nitrogen. The time of exposure was 60 sec. The PSF were injected intraperitoneally at a dose of 1 ml once a day over the whole course of experiments (concentration of peptides was 100 □g/ml). The control animals were injected with 1 ml of a physiological saline. A method of high-performance size-exclusion chromatography was applied for determining molecular-mass distribution of peptides.

The chromatograms of the rat native skin extracts showed 3 peaks. The low-molecular ones among them were the peaks for peptides with the mean molecular masses of 1438 and 1087, the relative square areas of which were 17.870 and 26.663%, respectively.

No differences in the states of the injuries in the experimental and control groups of animals were reported by the 3rd day of the experiment. The chromatograms of the skin extracts of control animals were characterized by 6 peaks, while injection of the PSF to the animals brought about 8 peaks.

By the 14th day the differences in the states and square areas of the injuries were manifested in the strongest way. Within the control group the freezing injuries remained hyperemic still, demonstrating the isles of fibrinous accretion, and crusts which were difficult to peel out were evidenced here and there. Following injection with the PSF the surfaces of the injuries became pink-coloured, smooth and granulated.

The chromatograms of the control animal extracts showed 11 peaks by the 14th day. The highest among them corresponded to the fraction of peptides with a molecular mass of 1600. Following injection of the PSF to the rats the chromatograms registered 6 peaks, and the highest among them was also the peak, corresponding to peptides with the molecular mass of 1600.

The peptide composition was normalized by the 21st and 28th days, and this process was stronger manifested in the PSF-injected animals.

Thus, it may be concluded on the peptide composition of the rat skin exposed to freezing injury to be dependent on the stage of the wound process, while injection of the PSF to the animals affects the rate of wound healing and molecular-mass distribution of peptides within the extracts.

МОДУЛЮЮЧА ДІЯ СПОЛУК АЛЮМІНІЮ НА ДИНАМІЧНІ ПАРАМЕТРИ СКОРОЧЕННЯ ТА СУПЕРПРЕЦИПІТАЦІЮ АКТОМІОЗИНУ М'ЯЗІВ

Богуцька К.І., Ноздренко Д.М., Мінченко П.Г.

Навчально-науковий центр «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail: biophys@univ.kiev.ua

З наукової літератури відомо, що іони алюмінію можуть виявляти токсичну дію на живі організми, що супроводжується порушенням нормальних обмінних процесів та розвитком різних патологій. Джерелом надходження алюмінію до організму можуть бути його комплекси з поліфенолами рослинного походження, питна вода, їжа, різні побутові косметичні засоби, фармацевтичні препарати та вакцини, внаслідок чого може відбуватись акумуляція алюмінію в органах і тканинах [1-3]. На сьогодні значна кількість праць присвячена дослідженню впливу на організм людини та тварин фосфіду алюмінію, який широко використовується у складі пестицидів, зокрема інсектицидів та родентицидів (зооцидів), що може призводити до отруєнь [4, 5]. Крім того, значна увага приділяється вивченню можливих молекулярних механізмів впливу алюмінію на центральну нервову систему (різні форми алюмінозу), кісткову, скоротливу та серцево-судинну системи людини. Що стосується впливу іонів алюмінію на механізми м'язового скорочення, то з аналізу літературних даних можна зробити припущення, що його дія може бути направлена як на нервово-м'язову передачу, так і безпосередньо на скоротливий апарат м'язів [6-8].

Метою роботи було дослідження впливу хлориду алюмінію та його суміші з рутином на динамічні параметри скорочення скелетного м'яза та на реакцію суперпреципітації актоміозину скелетних і серцевого м'язів. Для досліджень використовували загальноприйняті методики з деякими модифікаціями [8, 9].

Результати досліджень. При дослідженні зміни динамічних параметрів скорочення скелетном'язових волокон в ізотонічному режимі під впливом двокомпонентної модульованої електростимуляції було встановлено зміну сили та довжини м'язових волокон залежно від концентрації хлориду алюмінію. Оскільки відомо, що комплекси флавоноїдів з металами мають кращу проникність через мембрани, проводили дослідження впливу комплексу іонів алюмінію з рутином на скорочення скелетного м'яза та на суперпреципітацію актоміозину скелетного і серцевого м'язів. У результаті встановлено, що ці комплекси характеризуються значною інгібіторною дією на динамічні параметри скорочення порівняно з безпосереднім впливом досліджуваних сполук окремо, а реакція суперпреципітації актоміозину серцевого м'яза носить більш повільний характер порівняно з актоміозином скелетних м'язів. Разом з тим, характер впливу іонів алюмінію на суперпреципітацію актоміозину серцевого м'яза подібний до того, який спостерігається у випадку актоміозину скелетних м'язів, а саме: за певних концентрацій іони алюмінію сповільнюють реакцію суперпреципітації актоміозину і знижують ступінь суперпреципітації, а за більш високих концентрацій пригнічують дану реакцію. Отже, виявлено факт концентраційно залежного інгібування іонами алюмінію реакції суперпреципітації актоміозину серцевого м'яза. Специфічну дію алюмінію можна пояснити як безпосереднім впливом іонів, що зв'язуються, на активний центр білка, так і опосередкованим впливом через комплексоутворення с субстратом або через зміну конформації макромолекули в цілому. Ймовірно при цьому реалізуються різні механізми реакції суперпреципітації. Оскільки комплексоутворюючі характеристики актоміозину в цих станах відрізняються, переходи між ними можна розглядати як можливу регуляторну ланку функціонування міофібрилярного апарата.

Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено, що іони алюмінію (окремо або у комплексах) за певних концентрацій значною мірою впливають на динамічні параметри скорочення, а також пригнічують реакцію суперпреципітації актоміозину серцевого та скелетних м'язів. Ці факти можуть мати важливе значення для подальших досліджень впливу іонів алюмінію з метою обгрунтованої корекції при патологічних станах організму.

Література:

1. *Y. Yamamoto, Y. Katoh, T. Sato.* // Determination of aluminum in various biological materials using Instrumental Neutron Activation Analysis. - Leg. Med. (Tokyo), 2009, №11, sup.1, p. S440-442.
2. *P. Nayak.* // Aluminium: impacts and disease. - Environ. Res., 2002, v.89, №2, p. 101-115.
3. *C. Exley, L. Swarbrick, R.K. Gherardi, F.J. Authier.* // A role for the body burden of aluminium in vaccine-associated macrophagic myofasciitis and chronic fatigue syndrome. - Med. Hypotheses, 2009, v.72, №2, p. 135-139.
4. *A. Proudfoot.* // Aluminium and zinc phosphide poisoning. - Clin. Toxicol., 2009, v.47, №2, p. 89-100.
5. *L. Easterwood, M.K. Chaffin, P.S. Marsh, B. Porter, C. Barr.* // Phosphine intoxication following oral exposure of horses to aluminum phosphide-treated feed. - J. Am. Vet. Med. Assoc., 2010, v.236, №4, p. 446-450.
6. *М.С. Мірошниченко, П.Г. Мінченко, М.Ф. Шуба.* // Вплив алюмінію на суперпреципітації актоміозину. - Доповіді АН України, 1993, №6, с. 78-81.
7. *М.С. Мірошниченко, Т.Л. Давидовська, Н.Є. Нурищенко, К.І. Богуцька.* // Дія сполук алюмінію на гладенькі м'язи та скоротливі білки скелетних м'язів. - Матеріали Міжнар. наук.-практ. конф. «Біомінералогія–2008», Луцьк, 2008, с. 97-101.
8. *К.І. Богуцька, В.М. Данилова, П.Г. Мінченко, Л.П. Шеремет, М.С. Мірошниченко.* // Вплив іонів алюмінію на суперпреципітацію актоміозину серцевого та скелетних м'язів. - Биополимеры и клетка, 2003, т.19, №4, с. 362-366.
9. *М.С. Мірошниченко, Д.М. Ноздренко, Ю.І. Прилуцький.* // Динаміка скорочення ізольованого м'язового волокна. - Фізика живого, 2002, №2, с. 71-77.

MODULATORY EFFECT OF ALUMINUM COMPOUNDS ON THE DYNAMIC PARAMETERS OF MUSCLE CONTRACTION AND ACTOMYOSIN SUPERPRECIPITATION

Bogutska K.I., Nozdrenko D.M., Minchenko P.G.

Kyiv National Taras Shevchenko University, Educational and Scientific Center «Institute of Biology», Kyiv, Ukraine
e-mail: biophys@univ.kiev.ua

Introduction. It is known that aluminum ions can detect toxic effects on living organisms, accompanied by violation of normal metabolism and development of various pathologies. Sources of aluminum income to the organism can be its complexes with phenols of plant origin, drinking water, food and various household cosmetics, pharmaceuticals and vaccines, which cause aluminum accumulation in organs and tissues [1-3]. Today a significant number of works devoted to the aluminum phosphide effect on the human organism and animals, which is widely used in pesticide's compound, including insecticides and rodenticides, that can lead to poisonings [4, 5]. Moreover, much attention is paid to study the possible molecular mechanisms of aluminum influence on the central nervous system, bone, contractile and cardiovascular systems of man. As for the aluminum ions effect on the mechanisms of the muscle contraction, one can assume that its action may be directed to both neuromuscular transmission and muscle contractile apparatus [6-8].

The aim of present work was to study the influence of aluminum chloride and its mixtures with routine to reduce on the dynamic parameters of skeletal muscle contraction and the superprecipitation reaction of skeletal and cardiac muscle actomyosin. The known methods with some modification were used for our studies [8, 9].

Research results. During the study dynamic parameters of skeletal muscle fibers contraction in isotonic mode under the influence of two-component modulated electrical stimulation the changing the strength and length of muscle fibers depending on the concentration of aluminum chloride solution was found. Since it is known that flavonoids with metal complexes have better penetration through membranes, we have conducted the research of the effect of aluminum ions complex with routine the skeletal muscle contraction and superprecipitation actomyosin of skeletal and cardiac muscles. The result revealed that these complexes are characterized by a significant inhibitory effect on the dynamic parameters of muscle contraction compare with the direct influence of above compounds separately, and the superprecipitation reaction of cardiac muscle actomyosin is slower than the nature of skeletal muscle actomyosin. However, the nature of the influence of aluminum ions on the cardiac muscle actomyosin superprecipitation is similar to that observed in the case of skeletal muscles actomyosin, namely: aluminum ions at certain concentration the slow superprecipitation reaction of actomyosin and reduces the superprecipitation degree, but at higher concentrations they inhibit this reaction. Thus, the fact of concentration dependent inhibition of the cardiac muscle actomyosin superprecipitation by aluminum ions was shown. Specific effect of aluminum can be explained as the direct influence of ions, which bind, on the active center of protein and indirect influence by changing the conformation of macromolecules in general. Probably the different mechanisms of superprecipitation reaction are realized. Since actomyosin complex properties are different in these states, the transitions between them can be considered as a possible regulatory link of myofibril functioning unit.

Conclusions. Thus, it was found that aluminum ions (alone or in complexes) in certain concentrations significantly affect the dynamic parameters of contraction, and inhibit superprecipitation reaction of cardiac and skeletal muscle actomyosin. These facts may be important for further studies of the effect of aluminum ions to reasonable correction of pathological states.

References:

1. *Y. Yamamoto, Y. Katoh, T. Sato.* // Determination of aluminum in various biological materials using Instrumental Neutron Activation Analysis. - Leg. Med. (Tokyo), 2009, №11, Sup.1, p. S440-442.
2. *P. Nayak.* // Aluminium: impacts and disease. - Environ. Res., 2002, v.89, № 2, p. 101-115.
3. *C. Exley, L. Swarbrick, R.K. Gherardi, F.J. Authier.* // A role for the body burden of aluminium in vaccine-associated macrophagic myofasciitis and chronic fatigue syndrome. – Med. Hypotheses, 2009, v.72, №2, p. 135-139.
4. *A. Proudfoot.* // Aluminium and zinc phosphide poisoning. - Clin. Toxicol., 2009, v.47, №2, p. 89-100.
5. *L. Easterwood, M.K. Chaffin, P.S. Marsh, B. Porter, C. Barr.* // Phosphine intoxication following oral exposure of horses to aluminum phosphide-treated feed. - J. Am. Vet. Med. Assoc., 2010, v.236, №4, p. 446-450.
6. *M.S. Miroshnichenko, P.G. Minchenko, M.F. Shuba.* // The influence of aluminum ions on actomyosin superprecipitation. DAN, 1993, №6, p. 78-81.
7. *M.S. Miroshnichenko, T.L. Davidovska, N.E. Nurischenko, K.I. Bogutska.* // Effects of aluminum compounds on smooth muscle and contractile proteins of skeletal muscles. - Materials of scientific-practical. conf. "Biomineralogy-2008", p. 97-101.
8. *K.I. Bogutska, V.M. Danilova, P.G. Minchenko, L.P. Sheremet, M.S. Miroshnichenko.* // The influence of aluminum ions on the superprecipitation of cardiac and skeletal muscle actomyosin. - Biopolymers and cell, 2003, v.19, №4, p. 362-366.
9. *M.S. Miroshnichenko, D.M. Nozdrenko, Y.I. Prylutskyy.* // The dynamic of isolated muscle fiber contraction. - Physics of the Alive, 2002, №2, p. 71-77.

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕПТИДА ПРОЛИЛ-ГЛИЦИЛ-ПРОЛИНА (PGP)

Бондаренко Н.С., Умарова Б.А., Копылова Г.Н., Голубева М.Г., Самонина Г.Е.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
e-mail: n.s.bondarenko@gmail.com

Течение многих патологических процессов сопряжено с воспалением. При этом развиваются различные нарушения органов и систем организма. Часто эти нарушения связаны с усилением активации тучных клеток (ТК) и выбросом из них провоспалительных медиаторов. Поэтому стабилизация ТК может являться одним из факторов, препятствующих развитию воспаления. Показано, что регуляторные пептиды семейства глипролинов обладают широким спектром биологической активности, в который входит также и противовоспалительное действие.

Противовоспалительное действие представителя глипролинов пептида PGP было изучено на двух моделях воспаления - экспериментальный острый перитонит у крыс, вызванный внутрибрюшинным введением 40% тиогликолата натрия, и локальный воспалительный отёк лап, вызванный подкожным введением гистамина (0,2 мг в объёме 0,1 мл) или каолина (10% раствор, 0,1 мл).

На модели перитонита у крыс было показано, что развитие воспалительной реакции вызывало нарушения функционального состояния микроциркуляторного русла брыжейки: замедлялся крово- и лимфоток, увеличился латентный период ответа лимфатических сосудов (ЛС) на норадреналин (НА), снизилась частота их сокращений в первую минуту и длительность ответа, уменьшилось число ЛС, ответивших на НА. Возникшие нарушения сопровождались усилением секреторной активности тучных клеток (ТК), что выражалось в увеличении индекса дегрануляции и количества сильно дегранулированных клеток. Предварительное введение PGP (в/б, 3,7 мкмоль/кг, за 15 мин до индукции воспаления) привело к снижению выраженности этих нарушений - увеличилось число спонтанно сокращающихся и ответивших на НА ЛС, нормализовался кровоток, параметры ответа ЛС на НА достоверно не отличались от нормы. При этом существенно снижался уровень секреторной активности ТК.

Кроме того, при остром перитоните у крыс наблюдалось уменьшение осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ), что связано с уменьшением скорости кровотока. На фоне предварительного (за 15 минут до индукции воспаления) введения пептида PGP изменения ОРЭ были значительно слабее, и процент гемолизированных клеток снижался. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что пептид при профилактическом применении оказывает протекторное действие на мембрану эритроцитов, повышая их осмотическую резистентность. В экспериментах in vitro PGP не изменял процент гемолиза интактных эритроцитов. Это подтверждает предшествующие наблюдения, что эффекты глипролинов проявляются лишь на фоне развития патологии.

По предварительным данным, также полученным на модели острого перитонита у крыс, можно говорить о том, что введение PGP (3,7 мкМ/кг, за 30 мин до индукции воспаления) препятствует увеличению проницаемости кровеносных сосудов в тонком кишечнике.

О противовоспалительном действии PGP свидетельствуют и результаты экспериментов, полученные на модели локального воспалительного отёка лапы. Было показано, что введение провоспалительных агентов вызывало локальную воспалительную реакцию, сопровождавшуюся гиперемией и отёком. Предварительное введение PGP уменьшало величину отёка, вызванного введением гистамина, в среднем на 30-45% по сравнению с контролем. Введение PGP до индукции воспаления каолином уменьшало величину отёка в течение первых трёх часов в среднем в 1,7-2,9 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, PGP оказывает противовоспалительное действие на разных экспериментальных моделях. Одним из механизмов этого действия может быть стабилизация ТК. Однако, учитывая полифункциональность исследуемого пептида, можно предположить, что это не единственный механизм противовоспалительного действия PGP. Сопоставление эффектов PGP и диклофенака, в экспериментах на модели отёка лапы, показало, что оба вещества уменьшали отёки. Это наводит на мысль о сходстве механизмов противовоспалительного действия PGP и диклофенака. Однако этот вопрос требует дальнейших исследований.

ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF PROLIL-GLYCIL-PROLINE PEPTIDE (PGP)

Bondarenko N.S., Umarova B.A., Kopylova G.N., Golubeva M.G., Samonina G.E.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
e-mail: n.s.bondarenko@gmail.com

A number of pathological processes are connected with inflammation that causes dysfunctions of different organs and systems of organism. Often these disorders are connected with the enhancement of mast cells' (MC) secretory activity. Therefore, stabilization of mast cells can prevent the development of inflammation. It was shown that regulatory peptides glyprolines have a wide spectrum of biological activity, and anti-inflammatory effect is among them.

Anti-inflammatory effect of glyproline PGP have been investigated on two experimental models: acute peritonitis in rats, caused by intraperitoneal injection of 40 % sodium thioglycolat, and rat paw edema, caused by subcutaneous injection of histamine (0,2 mg in 0,1 ml) or 10% kaolin (0,1 ml).

On the model of experimental acute peritonitis in rats it was shown that inflammation development led to dysfunction of rat mesentery microcirculatory bloodstream: the circulation of blood and lymph slowed, the latency period of lymphatic vessels (LV) reaction to noradrenalin (NA) lengthened, the frequency of LV contractions during the first minute and the time of reaction to NA decreased, the amount of LV responding to NA also decreased. These disorders were accompanied by the enhancement of mast cells' secretory activity. It was expressed in the advance of degranulation index and the increase of high degranulated cells number. The injection of PGP (i/p, 3,7 mkM/kg) 15 min before the induction of inflammation led to the reduction of these disorders' intensity: the amount of LV with spontaneous activity and LV responding to NA increased, blood circulation normalized, parameters of LV reaction to NA didn't significantly differ from the norm. The level of mast cells secretory activity also significantly decreased.

Furthermore, under condition of acute peritonitis in rats there was a depression of osmotic fragility (OF) that is connected with blood circulation slowing. Against PGP previous injection (15 min before the induction of inflammation) the OF changes were significantly less than without it. This data allow to conclude that peptide has a protective effect on erythrocytes' membrane and increases the OF. In *in vitro* investigations it was shown that PGP had no influence on intact erythrocytes' hemolysis. It confirms our suggestion that the effects of glyprolines exhibit only against pathology development.

According to our tentative data received on this model, the injection of PGP (3,7 mkM/kg) 30 min before the induction of inflammation also inhibited the increase of blood vessels permeability in small intestine.

The results of experiments on the model of rat paw edema were also indicative of PGP anti-inflammatory action. It was shown that injection of proinflammatory agents caused the local inflammatory reaction characterized by hyperemia and paw edema. The preventive injection of PGP decreased the histamine-induced edema size by 30-45% in comparison with control. The injection of PGP before the inflammation induction by kaolin 1,7-2,9-fold decreased the edema size during first three hours.

In the summary, PGP has an anti-inflammatory effect on different experimental models of inflammation. The mast cells stabilization can be one of mechanisms of this action. But considering the fact that PGP is polyfunctional peptide we can suppose that this mechanism of PGP anti-inflammatory effect is not singular. The comparison of PGP effect with the effect of diclofenac on the model of rat paw edema has shown that both substances reduced edemas. It conveys the suggestion that mechanisms of PGP and diclofenac anti-inflammatory actions can be analogous. But this question invites further investigations.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА Д5

[1]Бондаренко О.Б., [2]Дюбко Т.С.

[1] Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: o-bond009@mail.ru
[2] Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Киев, Украина

В последнее время значительно возрос интерес к применению тканевых препаратов при лечении различных заболеваний человека и животных. Это связано с рядом причин, среди которых можно отметить участившиеся случаи аллергических реакций на синтезированные химическим путем лекарственные препараты и снижением эффективности действия антибиотиков в результате возникновения лекарственной мультирезистентности. Препараты, полученные из тканей животных, благодаря отсутствию высокомолекулярных веществ белковой природы, не обладают ни гистологической, ни видовой специфичностью и не вызывают аллергических реакций. В то же время, благодаря содержанию естественных для организма компонентов, они обладают широким спектром терапевтического действия, оказывая, по сути, бионормализующий эффект.

Созданный нами бионормализатор Д5 представляет собой разработанную для подкожного введения инъекционную форму, основным действующим веществом которого является антисептик-стимулятор Дорогова АСД-2. В состав препарата также входят вещество-проводник, повышающий его всасывание, антиоксидант, стабилизатор, водно-солевой раствор и др. При поиске оптимального состава Д5 были протестированы в сравнительном аспекте физико-химические свойства препаратов АСД-2 различных производителей и проверена их совместимость с лекарственными средствами, часто употребляемыми при создании инъекционных форм (новокаин, лидокаин). По данным методов ^{1}H- и ^{13}C-ЯМР, рефрактометрии, денситометрии, хроматографии, спектрофотометрии, флуоресцентной спектроскопии, клиновидной дегидратации, свойства препаратов АСД-2 производства Армавирской биофабрики, (Россия), ЗАО «Алтекс» (Киев, Украина) и ООО «Ареал Медикал» (Россия), а также разных серий от одного и того же производителя различаются. Так, препараты армавирского и киевского производства нестабильны по составу от серии к серии, легко окисляются и подвержены расслоению при взаимодействии с растворами новокаина и лидокаина. Данные недостатки в меньшей степени присущи АСД-2 московского производства, который оказался наиболее предпочтительным для введения в состав инъекционной формы.

Ранее на лабораторных животных (крысы) нами было показано [1, 2], что при подкожном введении в дозе 0,5 мл/кг в течение 14 суток не обнаружено аллергических реакций (покраснения, почесывания) в месте инъекции Д5. Препарат не оказывает отрицательного влияния на внешний вид и функцию внутренних органов, в том числе сердечной мышцы, печени и почек животных. Имел место лишь статистически недостоверный сосудорасширяющий эффект. Препарат не влияет на содержание и активность аминотрансфераз в сыворотке крови крыс, что свидетельствует об отсутствии у него гепатотоксического эффекта и не влиял значительно на функцию почек, о которой судили по уровню креатинина в крови и моче. При введении в организм препарат не изменяет основные клинические показатели периферической крови, а *in vitro* при объемном соотношении 1:1 при комнатной температуре (20 ^{o}C) не разрушает эритроциты [3]. В то же время, Д5 активно взаимодействует с мембранами эритроцитов и альбумином плазмы. Обладает противовоспалительным и анальгезирующим действием, зависящим от дозы и способа введения в организм.

Тестирование Д5 на домашних животных, находящихся на амбулаторном лечении в ветеринарных клиниках г. Харькова и добровольцах показало его хорошую переносимость, отсутствие воспалительных и аллергических реакций в месте введения. После инъекции препарата в первую минуту возможна кратковременная болевая реакция. Препарат показал высокую результативность при лечении воспалительных и вирусных заболеваний домашних животных, в том числе бурситов, папиллом у собак. Вызывает торможение роста опухолей молочных желез у кошек. Имеется единичное наблюдение излечения бельма инфекционной природы у 3-месячного щенка. Получены также положительные результаты при применении Д5 в комплексном лечении нервной формы чумы у щенков и желтухи у кошки. Полученные результаты позволяют заключить, что препарат Д5 обладает выраженным иммуностимулирующим, антисептическим и регенерирующим действием. Позволяет снизить дозы применяемых антибиотиков и в ряде случаев отказаться от них.

Литература:

1. *Бондаренко О.Б.* // Тез. докл. научно-практич. конфер. «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения».- Новый Свет, Крым, Украина (25-30 мая 2009).- Киев: Mavis Publisher, 2009.- С. 235-236.
2. *Бондаренко О.Б.* // Вісник Харківського націон. ун-ту ім. В. Н. Каразіна. Сер: Біологія.- 2010.–Вип. 11 (№ 905).- С. 146-153.
3. *Bondarenko O.B., Zhegunov G.F.* // 17th meeting European Association for Red Cell Research (EARCR 2009).– Milano, Italy, 2009.– P. 60.

EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF D5 SUBSTANCE BIOLOICAL ACTIVITY

[1]Bondarenko O.B., [2]Dyubko T.S.

[1] A.J.Usikov Institute of Radiophysics and Electronics, National Academy of Sciences of Ukraine;
e-mail: o-bond009@mail.ru
[2] Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine

In recent time the interest to application of tissue extracts for treatment of various human and animals diseases has considerably increased. It is connected with a number of reasons among which it is possible to note the become frequent cases of allergic reactions to the drugs, synthesized by chemical way and decrease in antibiotics action efficiency as a result of drug multiresistance occurrence. The extracts, received from animal tissues, thanks to protein absence, don't possess neither histological, nor animal kind specificity and don't cause allergic reactions. At the same time, thanks to the presence of natural components of organism, they possess a wide spectrum of therapeutic action and render, in fact, ”bionormalization” effect.

Created by us D5 bionormalizator is a developed for hypodermic introduction injection form, the basic active substance of which is the Dorogov’s antiseptic-stimulator, fraction 2 (DAS-2). The D5 also include the substance-conductor, raising its absorption, the antioxidant, the stabilizer, water-salt solution, etc. During the search of D5 optimal composition, the DAS-2 properties from various manufacturers have been tested. The physical and chemical properties of DAS-2 have been tested in comparative aspect and their compatibility with the drugs, often used at the injection forms (novocain, lidocain) creation was checked up. According to ^{1}H - and ^{13}C-NMR, refractometry, densittometry, chromatography, spectrophotometry, fluorescent spectroscopy, wedge-shaped dehydratation methods data, the DAS-2 preparations of Armavir’s biofactory (Russia), "Alteks" Company (Kiev, Ukraine) and «Areal Medikal» Company (Russia) are different, and also different the properties of series from the same manufacturer. So, the substances obtained from Armavir’s and Kiev’s manufacturers have been astable macrostructure from series to series, they easily oxidized and subjected to segregation at novocain and lidocain interactions. The DAS-2 from «Areal Medikal» Company have less of undesirable properties, listed above and, therefore, it has been included in composition of D5 injection form.

It has been shown earlier on laboratory animals (rats) [1, 2] that hypodermic injection of D5 in dose of 0,5 ml/kg within 14 days doesn't cause any allergic reactions (reddening, etc.) in injection place. The D5 substance doesn't render negative influence on form and function of internal organs, including cardiac muscle, liver and kidneys of animals. The only statistically doubtful vasodilating effect took place. The D5 substance doesn't influence the aminotransferases maintenance and activity in whey of rats blood that testifies to hepatotoxical effect absence at it and didn't influence considerably kidneys function which judged on creatinine level in blood and urine. At introduction into the organism the substance doesn't change the basic clinical properties of peripheral blood, and at volume ratio 1:1 at room temperature (20 ^{o}C) doesn't destroy the erythrocytes *in vitro* [3]. At the same time, D5 actively interacted with erythrocyte membranes and plasma albumin, possesses anti-inflammatory and analgysing action depending on dose and way of introduction into the organism.

The D5 testing for the pets which are on out-patient treatment in Kharkov’s veterinary hospitals and volunteers has shown its good shipping, absence of inflammatory and allergic reactions in introduction place. The first minute short-term painful reaction is possible after injection. The substance has shown high productivity at treatment of inflammatory and virus diseases of pets, including bursits, papillomas of dogs. Causes growth inhibition of cats mammary gland tumors. There is an individual supervision of infectious nature cataract treatment for 3-month's puppy. Positive results are received also at D5 application in nervous form plague complex treatment of the puppies and the jaundice of cat. The results obtained allow to conclude that D5 possesses expressed immuno-stimulating, antiseptic and recycling action. Allows to lower of antibiotics doses applied and in some cases to refuse them.

References:

1. *Bondarenko O.B.* // Scientific conference “Biologically active substances: Fundamental and Applied Problems”.- Novy Svet, AR Crimea, Ukraine (May 25-30, 2009).- Kiev: Mavis Publisher, 2009.- P. 235-236.
2. *Bondarenko O.B.* // The J. of V.N. Karazin Kharkov National University. Ser: Biology.- 2010.– Issue. 11 (№ 905).- P. 146-153.
3. *Bondarenko O.B., Zhegunov G.F.* // 17th meeting European Association for Red Cell Research (EARCR 2009).– Milano, Italy, 2009.– P. 60.

ПЕРСПЕКТИВНІ РАДІОПРОТЕКТОРИ СЕРЕД 4-ТІОХІНОЛІНІВ

Бражко О.А., Корнет М.М., Завгородній М.П., Уліщенко Є.О., Бражко О.О.

Запорізький національний університет, Запоріжжя, Україна
e-mail: kornetmarina@mail.ru

До основних небезпек сьогодення відносять іонізуючу радіацію. Однією з основних причин пострадіаційної загибелі тварин є пошкодження молекул ДНК. Значна частина (60-80%) пошкоджень ДНК, викликаних радіацією, формуються за рахунок активних форм кисню (АФК), що утворилися в результаті радіолізу води. Надлишкове утворення АФК призводить до посилення небезпечних для життєдіяльності клітин процесів: вільнорадикального окиснення ліпідів, окисної модифікації білків та нуклеїнових кислот [1]. Тож, одним з критеріїв ефективних радіопротекторів є їх висока антирадикальна активність [2].

Різноманітні похідні хіноліну відомі як синтони в органічному синтезі та ефективні біологічно активні сполуки. За останнє десятиріччя з'явилась значна кількість публікацій, присвячених антиоксидантним властивостям різноманітних похідних хіноліну, що можуть стати основою для створення радіопротекторних препаратів з антиоксидантним механізмом дії [3]. Найбільш перспективними похідними є 4-тіохіноліни, що є ефективними "пастками" вільних радикалів.

За результатами віртуального PASS-прогнозу та власних багаторічних досліджень серед масиву 4-тіопохідних хіноліну було відібрано декілька найбільш перспективних сполук. Прогноз показав перспективність дослідження даних структур в якості "пасток" вільних радикалів, зокрема, супероксид-аніону, дуже токсичного гідроксил-радикалу, пероксидах сполук, та вивчення їх радіопротекторної дії. Необхідно відмітити відсутність негативних ефектів - високої токсичності, терато-, канцеро-, мутагенності та ембріотоксичності.

Експерименти, щодо визначення гострої токсичності показали, що досліджені сполуки за класифікацією Сидорова належать до малотоксичних та нетоксичних речовин, їх $ЛД_{50}$ лежить у межах від 179 до 1139 мг/кг. Сполуки з лабораторними шифрами **К-9** та **К-33** мають порівняно меншу токсичність (1139±96 та 357±43 мг/кг відповідно), ніж цистеамін (250±22), який застосовують як препарат порівняння при первинній оцінці радіопротекторних властивостей сполук. Дослідженні сполуки на моделі генерації супероксид-аніону *in vitro*, проявляють значну антиоксиданту активність і за низьких концентрацій перевершують препарат порівняння - цистеамін. За результатами визначення антиоксидантної активності методом імпульсної вольтамперометрії вони проявили себе як ефективні пастки гідроксил-радикалу та пероксидних сполук. Це дозволило віднести їх до превентивних антиоксидантів.

Вважаємо, що 4-тіохіноліни є перспективними радіопротекторами.

Література:

1. *Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков и др.* Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.
2. *Газиев А.И.* // Радиац. биология. Радиоэкол. – 1999. – Т. 39. – С. 630-638.
3. *Бражко О.А.* Біологічно активні похідні хіноліну та акридину з азото- та сірковмісними функціональними групами: автореф. дис. … доктора біол. наук: 02.00.10 / Бражко Олександр Анатолійович. Інститут біоорганічної та нафтохімії НАН України – К., 2005. - 43 с.

PERSPECTIVE RADIOPROTECTORS AMONG 4-THIOQUINOLINE

Brazhko O.A., Kornet M.M., Zavgorodny M.P., Ulishchenko E.O., Brazhko O.O.

Zaporizhia State University, Zaporizhia, Ukraine
e-mail: kornetmarina@mail.ru

To the basic dangers of present time carry ionizing radiation. One of principal causes the post of radiating destruction of animals is damage of molecules of DNA. Considerable part (60-80 %) damages of DNA caused by radiation are formed at the expense of active forms of oxygen (AFO) which were formed as a result radiolysis waters. Superfluous formation AFO leads to strengthening of cages of processes dangerous to ability to live: freely radical oxidation of lipids, oxidizing updating of proteins and nucleonic acids [1]. Therefore, their high antiradical activity [2] is one of criteria of effective radioprotectors.

Various derivatives quinoline are known as base in organic synthesis and effective biologically active compounds. For last decade have appeared a significant amount of the publications devoted antioxidants to properties of various derivatives quinoline. They can become a basis for radioprotector preparations with antioxidants the mechanism of action [3]. The most perspective derivatives are 4-thioquinoline that is effective free radical scavenger.

By results of the virtual PASS-forecast and own long-term researches among a file 4-thioderivatives quinoline the most perspective connections have been selected some. The forecast has shown perceptivity of research of the given structures as free radical scavenger, for example, superoxide-anion, very toxic hydroxyl-radical, peroxide substance, and studying of their radioprotection actions. It is necessary to note absence of negative effects - high toxicity, mutagenicity, carcinogenicity, teratogenicity and embryotoxicity.

Experiments, concerning definition of sharp toxicity have shown that the investigated connections behind Sidorov's classification belong to a little toxically and to nontoxic substances, them LD_{50} lies in limits from 179 to 1139 mg/kg. Connections with laboratory code numbers **К-9** and **К-33** have rather smaller toxicity (1139±96 and 357±43 mg/kg accordingly), than cysteamine (250±22) which apply as a comparison preparation at a primary estimation of radioprotector properties of connections. Connection research on generation model superoxide-anion *in vitro*, shows considerable to an antioxidant activity and at low concentration surpass a comparison preparation – cysteamine. By results of definition antioxidant activity impulsive voltamperometry they have proved a method as effective free scavenger of hydroxyl-radical and peroxide compounds. It has allowed carrying them to preventive antioxidants.

We consider that 4-thioquinoline is perspective radioprotectors.

References:

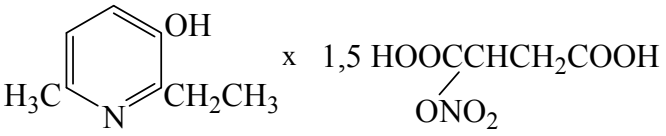
1. *Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков и др.* Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.
2. *Газиев А.И.* // Радиац. биология. Радиоэкол. – 1999. – Т. 39. – С. 630-638.
3. *Бражко О.А.* Біологічно активні похідні хіноліну та акридину з азото- та сірковмісними функціональними групами: автореф. дис. … доктора біол. наук: 02.00.10 / Бражко Олександр Анатолійович. Інститут біоорганічної та нафтохімії НАН України – К., 2005. - 43 с.

МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНОСТЬ ПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ НИТРОКСИМЕКСИДОЛА

Варфоломеев В.Н., Федоров Б.С.,Фадеев М.А., Штолько В.Н., Безуглова Г.Н.

Институт проблем химической физики РАН, Москва, Россия
e-mail: varfol@icp.ac.ru

В Институте проблем химической физики РАН синтезировано новое гибридное соединение, относящееся к новому производному 2-этил-6-метил-3-оксипиридина, конкретно к нитроксисукцинату 2-этил-6-метил-3-оксипиридину формулы (Нитроксимексидол (НМ) :



На модели эмоционально-болевого стресса на крысах проведено исследование анти стрессорного действия НМ. Изучено изменение массы тела и ряда внутренних органов и биохимические показатели крови, характеризующие интенсивность протекания процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантный статус крови, а также интенсивность образования $NO^{\cdot}$

.Как показали проведенные исследования состояния про- и антиоксидантных систем крови предварительное введение НМ не только ограничивает проявление стресс-реакции, активацию пероксидации липидов и белков при стрессе, но и сохраняет эффективный контроль процессов свободнорадикального окисления со стороны антиоксидантной системы. Установлено, что применение препарата ФБ-26 оказывает достаточно выраженное гепатопротекторное действие, о чем свидетельствует снижение активности маркерных ферментов цитолиза клеток печени – аспартат- (АсАТ) и аланин-аминотрансферазы (АлАТ) в сыворотке крови. Наличие гепатопротекторной активности у НМ подтверждается и нормализацией нарушений гистоструктуры печеночной паренхимы при токсическом повреждении тетрахлорметаном.

Исследовано антигипоксическое действие НМ. Мышей линии С 57 весом 25-27 г помещали в закрытый сосуд, создавая тем самым условия капсикамной гипоксии. Фиксировали время жизни животных. Показано, что введение НМ в дозе 50 мг/кг за 10 мин до помещения животных в замкнутый объем приводит к увеличению продолжительности жизни животных на 30-40 % по сравнению с контролем (введение внутри брюшинно физраствора).

Противоишемическое действие НМ оценивали на модели открытого сердца экспериментальных животных. Мышей линии линии С 57 весом 25-27 г забивали дислокацией шейных позвонков, вскрывали грудную клетку, обеспечивая возможность наблюдения за сокращающимся сердцем, и фиксировали время сокращения желудочков и предсердий сердца . Показано, что введение соединения 1 в дозе 50 мг/кг за 10 мин до забоя животных, приводит к увеличению времени сокращения желудочков с 10 мин 50 сек до 16 мин 25 сек по сравнению с контрольными животными. Время сокращения предсердий увеличивается с 35 мин до 55 мин.

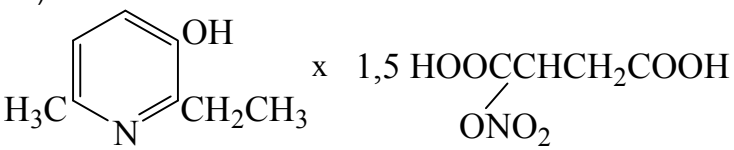
Таким образом приведенные данные свидетельствуют об эффективности НМ в качестве перспективного противогипоксического или антистрессорного средства, а также в качестве гепатопротектора.

MULTIFUNCTIONAL PROTECTIVE PROPERTIES OF NITROKSIMEKSIDOL

Varfolomeev V.N., Fedorov B.S., Fadeev M.A., Shtolko V.N., Bezuglova G.N.

Institute of Problemsof Chemical Physics, Moscow, Russia
e-mail: varfol@icp.ac.ru

The Institute of samples of chemical physics RAS synthesized new hybrid compounds belonging to a new derivative of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine, specifically nitroksisuktsinatu2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine (NITROXYMEXIDOL (NM):



On the model of emotional-pain stress in rats studied anti-stress action NM. The change in body weight and number of internal organs and blood biochemistry, characterizing. Use Intensity of the processes of lipid peroxidation and antioxidant status of blood, as well as the intensity of education NO.

As shown by studies of the state of pro-and antioxidant systems of blood pretreatment NM not only limits the expression of stress response, activation of lipid peroxidation and protein during stress, but also retains effective control of free radical oxidation of the antioxidant system. Established that the use of the NM has a sufficiently pronounced hepatoprotective effect, as evidenced by the decrease in activity of marker enzymes cytolysis of liver cells - aspartate (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in serum. The presence of hepatoprotective activity of the NM is confirmed by the normalization violations histostructure hepatic parenchyma at toxic damage of carbontetrachloride.

Investigated the effect of antihypoxia NM. Line mice from 57 weight 25-27 g were placed in a closed vessel, thereby creating conditions kapsikamic hypoxia. Recorded during the life of animals. It is shown that the introduction of NM at a dose of 50 mg / kg for 10 min before placing animals in a confined space increases the life span of animals by 30-40% compared with the control (injection of saline solution within the peritoneal).

Antiischemic effect of the drug was evaluated on a model of open heart in experimental animals. Mice of the line with 57 weighing 25-27 g were killed by a dislocation of the cervical vertebrae, opened the chest, providing the opportunity to monitor the contracting heart, and fixed the time of ventricular and auricle contraction and cardiac sinus. Shown that the introduction of compound 1 in a dose of 50 mg / kg 10 minutes before the slaughter of animals, leads to an increase in the time of ventricular contraction from 10 min 50 sec to 16 min 25 sec compared with control animals. While reducing auricle increased from 35 min to 55 min.Thus, the data show the effectiveness of NM as a promising antihypoxic or anti-stress tools, as well as hepatoprotector.

РЕГУЛЯЦІЯ ОБМІНУ ВІТАМІНУ D_3 ГЛЮКОКОРТИКОЇДАМИ

Великий М.М., Хоменко А.В., Лотоцька О.Ю., Безусяк А.І., Василевська В.М., Макарова О.О., Донченко Г.В.

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, Україна
e-mail: veliky@biochem.kiev.ua

Глюкокортикоїди широко використовуються в сучасній медицині завдяки яскраво вираженим антизапальним та імунодепресивним властивостям. Однак їх довготривале застосування має ряд побічних ефектів, серед яких найбільш вираженими є патології кісткової тканини, що достовірно збільшує ризик розвитку остеопорозу та переломів кісток. Можливі механізми розвитку глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу включають: інгібуючу дію глюкокортикоїдів на остеобласти, остеоцити та остеокласти, що веде до зниження ремоделювання кісток (гальмування утворення кісткової тканини та посилення її резорбції), послаблення репарацій мікропорушень в клітинах кісткової тканини і як наслідок посилення апоптозу остеобластів та остеоцитів; посилення екскреції в нирках та зменшення абсорбції кальцію в кишечнику, що обумовлює виникнення негативного балансу кальцію та розвитку вторинного паратироїдизму. Причиною цих порушень може бути вплив глюкокортикоїдів на метаболізм вітаміну D_3.

Мета дослідження: вивчити вплив різних доз преднізолону на D_3-вітамінний, мінеральний обмін та структурно-функціональний стан гепатоцитів. Дослідження проводили на щурах лінії Wistar масою 100±5г. Тваринам, що утримувались на дієті віварію, вводили щодоби по 0,5 мг й 1,0 мг преднізолону протягом 14 діб. Рівень кальцію, неорганічного фосфору, активність лужної фосфатази та її ізоформ у сироватці крові, загальних ліпідів, фосфоліпідів й холестеролу у гепатоцитах визначали за допомогою біо-тест наборів (ЛАХЕМА, Чехія). Вміст $25OHD_3$ у сироватці крові та активність вітамін D_3 25-гідроксилаз у гепатоциах визначали методом радіоконкурентного зв'язування після екстракції $25OHD_3$ сумішшю органічних розчинників та хроматографічного розділення на колонках з окисом алюмінію та LH-20. Гістологічні дослідження печінки проводили на зрізах забарвлених гематоксиліном Бомера та еозином.

Встановлено, що при введенні преднізолону щурам активність вітамін D_3 25-гідроксилазних ензимів значно знижується. При цьому ефект залежить від дози введеного препарату: при введенні 0,5 мг та 1,0 мг преднізолону активність досліджуваних ензимів знижується відповідно на 41% та 70%. Тобто, отримані результати свідчать, що гормонотерапія негативно впливає на функціональну активність гепатоцитів. Інгібування активності ензимів супроводжується зниженням рівня $25OHD_3$ у сироватці крові. Так, при введенні 0,5 мг преднізолону вміст $25OHD_3$ зменшується у 3 рази порівняно з контрольними показниками. За цих умов діагностується D-вітамінний дефіцит, тобто найбільш глибокий стан порушення забезпеченості організму холекальциферолом. При збільшенні дози преднізолону в 2 рази (1 мг щодоби) вміст $25OHD_3$ зменшується в 2,3 рази порівняно з контролем, але у 1,3 рази вищий за його вміст у групі, яка отримувала 0,5 мг препарату щодоби.

Однією з причин гальмування активності вітамін D_3 25-гідроксилаз та зниження вмісту $25OHD_3$ під впливом преднізолону може бути його негативний вплив на стан гепатоцитів, в яких локалізовані 25-гідроксилазні ензими і де відбувається перший етап гідроксилювання вітаміну D_3 у 25 положенні. Гістохімічними дослідженнями виявлено дозозалежне зменшення кількості гепатоцитів та порушення їх структур: в цитоплазмі виявлено осередки некрозу та ознаки дистрофії; мембранні структури потовщені; в багатьох клітинах відсутні ядра й не виявляються ядерця, що свідчить про порушення функціональної активності гепатоцитів. Ці дані підтверджуються біохімічними показниками порушення ліпідного складу гепатоцитів.

Оскільки однією з найважливіших функцій вітаміну D_3 є регуляція мінерального обміну, а введення глюкокортикоїдів супроводжується зниженням забезпеченості організму вітаміном D_3, а також враховуючи відомий факт впливу гормону на кальцієвий обмін шляхом зниження його абсорбції у кишечнику й реабсорбції у нирках, ми вважали доцільним дослідити вплив преднізолону на мінеральний обмін. Показано, що преднізолон дозозалежно знижує рівень загального кальцію на 15% та 25% відповідно, в основному, за рахунок його фізіологічно активної (ультрафільтрувальної) фракції. За цих умов відбувається зниження вмісту неорганічного фосфору на 8 та 17% відповідно. Тобто, отримані результати свідчать, що введення кортикостероїдних гормонів супроводжується гіпокальціємією й гіпофосфатемією.

Порушення мінерального обміну в організмі супроводжується збільшенням активності загальної лужної фосфатази та її ізоензимів. Найбільш виражене зростання активності лужної фосфатази відбувається при введенні великих доз преднізолону на 43 і 64% відповідно. Причиною зростання активності кишкового ізоензиму лужної фосфатази у сироватці крові є підвищений вихід цієї ізоформи із ентероцитів у кров'яне русло, аналогічно тому, як це відбувається при D-гіповітамінозі, оскільки при дефіциті вітаміну синтез цього ензиму у кишечнику інгібується. Зростання активності кісткової ізоформи є наслідком порушення процесу ремоделювання клітин кісткової тканини та її мінералізації. Встановлено, що під дією преднізолону знижується вміст кальцію та зростає неорганічний фосфор у кістковій тканині.

Таким чином, отримані результати свідчать, що причиною гіпокальціємії та гіпофосфатемії за призначення кортикостероїдних гормонів є зниження забезпеченості організму вітаміном D_3 внаслідок інгібування активності вітамін D_3 25-гідроксилазних ензимів у гепатоцитах, зниження кількості та порушення структурно-функціонального стану цих клітин.

REGULATION OF VITAMINE D_3 METABOLISM BY GLUCOCORTICOIDS

Veliky M.M., Chomenko A.V., Lototska O.U., Besusyak A.I., Vasylevska V.M., Makarova O.O., Donchenko G.V.

O.V. Palladin Institute of biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: veliky@biochem.kiev.ua

Glucocorticoids are known drugs that are widely used in medical practice due to their profound ability to suppress immunity and counteract inflammation. However, their long-term clinical application may have some tremendous effects in various tissues. There has been increasing evidence that glucocorticoids over-supplementation is involved in the bone pathology, contributing to osteoporosis development and increased incidence of bone fractures. The possible mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis are following: inhibiting effects of the hormones on osteoblasts, osteocytes and osteoclasts that leads to the impairment of bone remodeling (slowing down the bone tissue formation and increasing of its resorption); disruption of reparation processes in bone tissue cells with subsequent apoptosis of osteoblasts and osteoclasts; elevating of calcium excretion in kidneys and reduction of its absorption in intestines that may be attributable to negative calcium balance in organism and secondary paratyreoidism. The reasons for these abnormalities might be associated with glucocorticoids influence on vitamin D_3 metabolism. In light of this, the study was aimed at evaluating the dose-dependant effects of prednisolon on the mineral and vitamin D_3 metabolism as well as structural and functional state of hepatocytes.

The experiments were carried out on female Wistar rats with body weight 100±5g. The animals were daily treated with or without prednisolon in doses 0.5 mg or 1.0 mg (i. p.) for 14 days. The levels of calcium and inorganic phosphorus, the activities of alkaline phosphatase and its isoforms in blood serum as well as the levels of total lipids, phospholipids and cholesterol in hepatocytes were determined by using the Bio-test kits (LAHEMA, Czech Republic). The 25OHD3 content in blood serum and the activities of vitamin D3 25-hydroxylases in hepatocytes were measured by radio competitive binding following 25OHD3 extraction with a mixture of organic solvents and chromatographic separation on columns of alumina and LH-20. Histological study of liver tissue were performed on sections stained with Bomer hematoxylin and eosin.

Prednisolon treatment was associated with the significant decrease in the activity of vitamin D3 25-hydroxylases. This effect was found to be strongly dependent on the drug dose: in fact, 0.5 mg and 1 mg prednisolon administrations resulted in 41 та 70% reduction of the enzymatic activities respectively. These data suggest that the hormonal therapy with prednosolon had deleterious influence on the functional activity of hepatocytes. Inhibition of vitamin D3 25-hydroxylases was accompanied by the lowering of 25OHD3 content in blood serum. The treatment with prednisolon in lower dose caused 3-fold decrease in serum 25OHD3 level as compared with control. This condition may reflect the state of animals exhibiting the signs of D-vitamin deficiency, when the deepest impairment in cholecalciferol availability occurs. The content of 25OHD3 was 2.3-fold decreased as compared with control in case of prednosolon treatment in higher dosage (1 mg), but its level was, however, 1.3-fold higher than the content of 25OHD3 in those animals which received 0.5 mg of the drug.

Prednisolon-induced inhibition of the activity of vitamin D_3 25-hydroxylases and the drop in $25OHD_3$ could be mediated via the negative effect of the compound on the functional state of hepatocytes, where 25-hydroxylases reside and the first step of vitamin D_3 hydroxylation in 25th position was proven to take place. Histochemical studies revealed dose-dependent decrease in the amount of hepatocytes and the impairment of their structure: the cytoplasm bore the signs of necrosis and dystrophy; the membrane structures were thickened; the nuclei and nucleoli were absent in many cells. Collectively, these observations reflect significant alterations of hepatocyte functional activity and prednisolon-related changes were further confirmed by impaired lipid composition of hepatocytes.

Given that, on the one hand, vitamin D_3 strongly influences mineral metabolism and, on the other, glucocorticoids drastically decrease vitamin D_3 availability and taken into consideration the fact that glucocorticoids reduce intestinal calcium absorption and renal calcium reabsorption, we also focused our attention on studying prednisolon's action on mineral metabolism. Prednisolon was found to reduce in dose-dependent manner the level of total calcium by 15 та 25% respectively, mainly due to its physiologically active (ultrafiltrating) fraction. These changes were accompanied by respectively 8 and 17% lowering of non-organic phosphorus. Thus, the data obtained indicate that corticosteroid hormones administration facilitate hypocalcaemia and hypophosphataemia.

The disturbances in mineral metabolism are known to be associated with the increased activity of alkaline phosphatase and its isoenzymes. The most pronounced augmentation of the activity of alkaline phosphatase occured after prednisolon treatment in high doses (over 43 and 64% respectively). The rational for the elevation of the activity of intestinal isoenzyme in blood could be an exit of this isoenzyme from enterocytes as it also happens in D-hypovitaminosis. It is known that vitamin D deficiency leads to inhibition of alkaline phosphatase in intestine. The increased activity of the bone alkaline phosphatase isoform is usually results from impaired remodeling of the bone tissue cells and bone mineralization. It was established that prednisolon treatment induced the reduction of calcium content in the bone with increasing effect on the content of non-organic phosphorus in bone tissue.

In whole, our findings suggest that corticosteroid-induced hypocalcaemia and hypophosphataemia are most likely caused by reduced vitamin D_3 availability as a result of vitamin D_3 25-hydroxylases inhibition in hepatocytes as well as decreased amount and impaired structural and functional state of these cells.

N,N'-ЗАМЕЩЕННЫЕ ПИПЕРАЗИНЫ – ИНГИБИТОРЫ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

[1]Веселкина О.С., [1]Викторов Н.Б., [2]Петрищев Н.Н.

[1]ЗАО «Вертекс», Санкт-Петербург, Россия
[2]Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия
e-mail: lasmed@ya.ru

В настоящее время среди препаратов, перспективных для профилактики и лечения заболеваний сердечнососудистой системы, широкое распространение получили замещенные азотсодержащие гетероциклические соединения, в частности, производные N-замещенных пиперазинов, обладающие широким спектром биологического действия. В этой связи, а также с целью разработки эффективных и безопасных препаратов, представляет интерес синтез новых производных N,N'-замещенных пиперазинов, обладающих антиагрегатной и антитромботической активностью.

Были исследованы N,N'-замещенные пиперазины, содержащие в качестве заместителя гидрокси- и сульфогруппы (ММ 426, 46), карбоксимидамидную (ММ 344, 88), гидрокси-, карбонильную и сульфогруппы (ММ 442,39). В качестве препарата сравнения использовали озагрел - (2E)-3-[4-(1H-имидазол-1-илметил) фенил] акриловой кислоты натриевая соль (ММ 272, 23), обладающих выраженной антиагрегатной активностью [1, 2].

Антиагрегатные свойства исследуемых веществ оценивали по их влиянию на агрегацию тромбоцитов в цельной крови в тестах с арахидоновой кислотой, коллагеном, АДФ и ристомицином (анализатор CHRONO-LOG 590, USA).

Озагрел в концентрации 5,0; 0,5 и 0,05 мкмоль/мл крови полностью подавлял агрегацию тромбоцитов в тесте с арахидоновой кислотой, но не влиял на АДФ индуцированную агрегацию. Достоверный ингибирующий эффект на коллаген- и ристомицин-индуцированную агрегацию был отмечен только при концентрации 5,0 мкмоль/мл.

Влияние N,N'-замещенного пиперазина, содержащего карбоксимидамидную группу, на агрегацию тромбоцитов по степени выраженности было таким же, как и у озагрела, но в отличии от последнего этот препарат оказывал выраженное угнетение АДФ-индуцированной агрегации.

N,N'-замещенные пиперазины, содержащие гидрокси- и сульфогруппу, а также гидрокси-, карбонильную и сульфогруппу только в концентрации 5,0 мкммоль/мл ингибировали агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ, а в тестах с ристомицином, коллагеном и арахидоновой кислотой эффект практически отсутствовал.

Таким образом, антиагрегатный свойства N,N'-замещенных пиперазинов определяются природой заместителей. Наибольший антиагрегатный эффект отмечен у N,N'-замещенного пиперазина, содержащего карбоксимидамидную группу. Это соединение обладает свойствами универсального ингибитора агрегации тромбоцитов: влияет на механизмы агрегации, связанные с активацией пуриновых рецепторов, активацией тромбоксансинтетазы и увеличением синтеза тромбоксана A_2 и активацтей гликопротеиновых рецепторов (GPIb и GPIIb/IIIa).

Влияние N,N'-замещенных пиперазинов на процесс тромбообразования изучали на модели лазериндуцированного тромба бедренной артерии у крыс [3]; особенностью этой модели является то, что в зоне локального фотодинамического повреждения стенки артерии происходит адгезия и агрегация тромбоцитов и формируется тромб. Предварительное внутривенное введение всех исследованных соединений препятствовало тромбообразованию, причем наиболее эффективным оказался N,N'-замещенный пиперазин, содержащий карбосимидамидную группу.

По эффективности воздействия на агрегационную активность тромбоцитов N,N'-замещенный пиперазин, содержащий карбоксимидамидную группу превосходит препарат сравнения — озагрел.

Литература:

1. *Terashita Z, Imura Y, Kawamura M et al.* Effects of thromboxane A2 synthase inhibitors (CV-4151 and ozagrel), aspirin, and ticlopidine on the thrombosis caused by endothelial cell injury // Thromb. Res. – 1995. – Vol. 77. – N 5. – P. 411-421.
2. *Петрищев Н. Н., Веселкина О. С., Чефу С. Г. и др.* Влияние Озагрела на процесс тромбообразования// Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2010. – Т. 9. – № 4. – С. 78–82.
3. *Петрищев Н.Н., Васина Е.Ю., Чефу С.Г., Шамцян М.М.* Модель экспериментального фототромбоза бедренной артерии крысы // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2009. – Т. 8. – № 1. – С. 42-45.

N,N′-DIFUNCTIONALIZED PIPERAZINES AS AN INHIBITORS OF PLATELET AGGREGATION

[1]Veselkina O.S., Viktorov N.B., [2,3]Petrishchev N.N.

[1] «Vertex» company, St-Petersburg, Russia
[2] I. P. Pavlov Federal Medical University, St-Petersburg, Russia
[3] V. A. Almazov Federal Heart, Blood and Endocrinology Centre, St-Petersburg, Russia
e-mail: lasmed@ya.ru

The functionalized nitrogen-containing heterocyclic compounds including the derivatives of N-substituted piperazines possess a variety of biological effects. In the recent years, these substances are considered as promising molecules for prevention and treatment of cardiovascular disease. In this regard, it might be tempting to consider the possibility of synthesis of novel derivatives of N,N′-difunctionalized piperazines which exhibit antithrombotic and antiplatelet activities.

We investigated the N,N′-difunctionalized piperazines containing hydroxyl and sulfate groups (MW 426, 46), carboxymideamide group (MW 344, 88), hydroxyl, carbonyl and sulfate groups (MW 442,39) as substituting groups. In controls, we used ozagrel (2E)-3-[4-(1H-imidazol-1-ylmethyl)phenyl]acrylic acid, sodium salt) (MW 272, 23) with potent antiplatelet activity [1, 2].

Antiplatelet properties of the drugs under investigation were tested according to their ability to inhibit arachidonic acid-, collagen-, ADP-, and ristomycine-induced platelet aggregation (CHRONO-LOG 590, USA).

Ozagrel at doses of 5,0, 0,5 and 0,05 μM/ml completely suppressed arachidonic acid-induced platelet aggregation but had no effect on ADP-induced aggregation. Significant inhibition of collagen- and ristomycine-induced platelet aggregation with ozagrel was observed at 5,0 μM/ml only.

The effect of carboxymideamide group-containing N,N′-difunctionalized piperazine on platelet aggregation was comparable to that of ozagrel but, in contrast to the latter, it had pronounced effect on ADP-induced platelet aggregation.

N,N′-difunctionalized piperazines containing hydroxyl and sulfate groups as well as hydroxyl, carbonyl, and sulfate groups inhibited ADP-induced platelet aggregation only at a dose of 5,0 μM/ml whereas no effect on arachidonic acid-, collagen-, and ristomycine-induced platelet aggregation was observed with use of these compounds.

It follows therefore, that antiplatelet properties of N,N′-difunctionalized piperazines are predetermined by the nature of substituting group. The most potent antiplatelet effect was noted in N,N′-difunctionalized piperazine containing carboxymideamide group. This compound possesses the properties of universal antiplatelet drug since it inhibited various mechanisms of aggregation including the activation of purinergic receptors, activation of thromboxane-synthase and increased synthesis of thromboxane A_2 as well as the activation of either GPIb or GPIIb/IIIa glycoprotein receptors.

The effect of N,N′-difunctionalized piperazines on thrombogenesis was studied in the laser-induced femoral artery thrombosis model [3]; in this model, platelet adhesion and aggregation with subsequent thrombus formation occurs in the area of local photodynamic injury of the vascular wall. Intravenous infusion of all studied drugs prevented thrombosis development; the most potent effect was observed after administration of carboxymideamide group-containing N,N′-difunctionalized piperazine. Antiplatelet effect of carboxymideamide group-containing N,N′-difunctionalized piperazine exceeds the effect of ozagrel.

References:

1. *Terashita Z, Imura Y, Kawamura M et al.* Effects of thromboxane A2 synthase inhibitors (CV-4151 and ozagrel), aspirin, and ticlopidine on the thrombosis caused by endothelial cell injury // Thromb. Res. – 1995. – Vol. 77. – N 5. – P. 411-421.
2. *Petrishchev N.N., Veselkina O. S., Chefu S. G. et al.*The effect of Ozagrel on thrombogenesis // Regional circulation and microcirculation. – 2010. – Vol. 9. – № 4. – P. 78–82 (in Russian).
3. *Petrishchev N.N., Vasina E.Yu., Chefu S.G., Shamtsian M.M.* Experimental photothrombosis in the rat femoral artery // Regional circulation and microcirculation. – 2009. – Vol. 8. – № 1. – P. 42-45 (in Russian).

МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ТРАНСДЕРМАЛЬНОГО ПРЕНЕСЕНИЯ ЛИПОСОМ

Винников А.И., Воронкова О.С.

Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара, Днепропетровск, Украина
e-mail: a_vinnikov@ukr.net

Сегодня липосомы рассматриваются как перспективные носители лекарственных средств не только для перорального, но и для парентерального использования. Одним из относительно новых направлений применеия липосомальных форм препаратов является их трансдермальный перенос, что преимущественно вызывает интерес у исследователей в области онкологии и дерматовенерологии (1).

Для проникновения через слои кожи любой частице необходимо иметь возможность прохождения через узкие межклеточные пространства, что невозможно для крупных молекул, обладающих зарядом. Липосомы же являются той оптимальной структурой, которая может решить проблему доставки многих препаратов к мишени, так как липиды, заполняющие межклеточное пространство, являются гидрофобной средой, пропускающей липиды, но не водорастворимые соединения. Для транспорта внутрь кожи каких-либо веществ, липосомные частички должны иметь в оболочке оптимальное соотношение гидрофильных и гидрофобных участков молекул, так как для практического применения липосом важна не только скорость, но и глубина проникновения различных соединений, транспортируемых ими (2).

С учетом сказанного выше, целью нашей работы было определить возможность применения микроскопического контроля для определения глубины проникновения липосом в слои кожи в эксперименте на белых лабораторных мышах.

Для исследования группе животных (n=9) на обритый участок кожи бедра наносили аппликацию липосомального препарата, включавшего акридин оранжевый. Аппликацию выдерживали 90 минут, после чего животных умерщвляли и проводили забор материала кожного покрова, из которого готовились гистологические препараты. В качестве контроля использовали препараты, полученные из кожи животных, которым наносили аппликацию акридина оранжевого, не включенного в липосомы. Исследование гистологических препаратов проводили при помощи светового и люминисцентного микроскопов при увеличении ×900. Размеры липосом определяли при помощи микроскопа «Эпивал» при увеличении ×500, а также спектрофотометра Specol 11 с использованием нефелометрического метода.

В ходе исследований установлено, что на полученных препаратах в течение 90 минут не происходило проникновения в слои кожи акридина оранжевого не включенного в липосомы, о чем свидетельствовало отсутствие свечения на срезах.

Определено, что в группе животных, которым делали аппликацию липосомального препарата, за 90 минут глубина проникновения липосом составила 30 мкм. На гистологическом срезе при использовании световой микроскопии были видны клетки зернистого слоя кожи, а при использовании люминисцентной микроскопии – точечное свечение акридина оранжевого, включенного в липосомы.

Было отмечено, что при трансдермальном переносе липосом определенную роль может играть их размер: на срезах обнаружены преимущественно липосомы среднего размера (от 0,8 до 12 мкм), гигантские липосомы (больше 20 мкм) отсутствовали.

Литература:

1. *С.М. Галицька, І.С. Нікольський* // Біологічні властивості ліпосом та їх практичне використання – Фізіологічний журнал, 2008, т. 54, № 5, с. 99-105.
2. *И.А. Карпушина, Т.Ф. Стеблева, Е.Ю. Бонитенко* // Применение методики направленного транспорта лекарственных веществ в клинической практике – Токсикология, 2004, т. 5, № 120, с.39-46.

MICROSCOPIC CONTROL TRANSDERMAL PRENESENIYA LIPOSOMES

Vinnikov A.I., Voronkova O.S.

Dnepropetrovsk National University Oles Gonchar, Dnepropetrovsk, Ukraine
e-mail: a_vinnikov@ukr.net

Today liposomes are considered as promising carriers of drugs not only for oral but also for parenteral use. One relatively new areas of application of liposomal forms of drugs is their transdermal transport that primarily is of interest to researchers in the field of oncology and dermatology and venereology (1).

To penetrate into the skin of any particle must be able to pass through the narrow intercellular spaces, which is impossible for large molecules with a charge. Liposomes are of the same optimal structure, which can solve the problem of delivery of many drugs to the target, so as lipids, which fills the intercellular space, are hydrophobic environment overlooking the lipids but not water-soluble compounds. For transport inside the skin of any substance, the liposome particles in the shell should have an optimum ratio of hydrophilic and hydrophobic parts of molecules, as for the practical application of liposomes is not only speed but also the depth of penetration of various compounds to be transported by them (2).

The aim of our study was to determine the possibility of microscopic control to determine the depth of penetration of liposomes into the skin in experiments on white laboratory mice.

To study the group of animals (n = 9) on the shaven skin with hip applique applied liposomal preparation comprising acridine orange. Applique withstand 90 minutes, after which the animals were sacrificed and biopsy specimens were carried out of the skin, from which prepare histological specimens. As a control, drugs derived from animal skin, which causes applique acridine orange, are not included in the liposomes. Study of histological preparations were carried out using optical and luminescent microscope with magnification × 900. Sizes of liposomes were determined with a microscope "Epival" at magnification × 500, and the spectrophotometer Specol 11, using nephelometric method.

The studies found that the received preparate of acridine orange, which not included in the liposomes, within 90 minutes of penetration did not occur in the skin layers, as evidenced by the lack of glow on the sections.

Determined, that a group of animals that did applique liposomal preparate, for 90 minutes, the depth of penetration of liposomes was 30 microns. On histological sections using light microscopy, the cells granular layer of the skin were visible, and using fluorescent microscopy – spot the glow of acridine orange, included in liposomes.

It was noted that the transdermal transport of the liposomes may play a role of their size: the slices are found predominantly liposome average size (from 0.8 to 12 microns), the giant liposomes (greater than 20 microns) were absent.

References:

1. *С.М. Галицька, І.С. Нікольський* // Біологічні властивості ліпосом та їх практичне використання – Фізіологічний журнал, 2008, т. 54, № 5, с. 99-105.
2. *И.А. Карпушина, Т.Ф. Стеблева, Е.Ю. Бонитенко* // Применение методики направленного транспорта лекарственных веществ в клинической практике – Токсикология, 2004, т. 5, № 120, с.39-46.

ВЛИЯНИЕ АУТОЛОГИЧНОЙ ПУПОВИННОЙ КРОВИ НА ИММУННУЮ РЕАКТИВНОСТЬ ОРГАНИЗМА У НОВОРОЖДЕННЫХ СО СЛОЖНЫМИ ВРОЖДЕННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА

[1]Воробьева А.М., [1]Ткаченко Я.В., [2] Яковенко Л.Ф., [1]Федевич О.М., [1]Часовский К.С., [1]Третьякова И.О., [2]Капустян Л.Н.,[2] Сидорик Л.Л., [1]Жовнир В.А.

[1]ДУ Научно-практический медицинский центр детской кардиологии и кардиохирургии МОЗ Украины, Киев, Украина
[2] Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: yani_t2008@ukr.net

Хирургическая коррекция критических врожденных пороков сердца (ВПС) с использованием аппарата искусственного кровообращения (АШК) требует применения донорской крови. Переливание новорожденным компонентов донорской крови сопряжено с риском развития трансмиссивных инфекций, иммунологических осложнений. Аутологичная пуповинная кровь является альтернативой использования донорской крови, однако ранее при хирургической коррекции сложных ВПС не применялась. Важной задачей является поиск маркеров безопасности и эффективности ее применения в неонатальной кардиохирургии. В последнее время большое внимание уделяется исследованию роли молекулярних шаперонов, в часности белка теплового шока 60 (heat shock protein 60, Hsp60) и антител к нему в патогенезе различных заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых. Экспериментально было показано, что анти-Hsp60 антитела способны усиливать воспалительные реакции, вызванные экстрацеллюлярным Hsp60, в том числе продукцию провоспалительных цитокинов (1). Установлено связь между наличием в дооперационный период циркулирующих анти-Hsp60 антител у взрослых пациентов с операциями на сердце и развитием в послеоперационном периоде фибрилляции предсердия (2). Данные относительно анти-Hsp60 реактивности, продукции провоспалительных цитокинов в послеоперационном периоде при использовании у новорожденных аутологичной пуповинной крови отсутствуют.

Мы провели сравнительный анализ показателей уровня анти-Hsp60 антител и провоспалительных цитокинов у новорожденных с транспозицией магистральных сосудов, которым провели операцию артериального переключения с применением аутологичной пуповинной крови либо с применением компонентов донорской крови. Первая группа состояла из 12 новорожденных, операция у которых проводилась в первые 2-6 часов после рождения с применением аутологичной пуповинной крови. Вторая группа - 25 новорожденных, операция проводилась через 2-7 дней после рождения с использованием компонентов донорской крови. Контрольную группу составили 20 клинически здоровых новорожденных.

В послеоперационном периоде у исследуемых пациентов выявлены следующие особенности: 1) легочные осложнения и гипертермия были только у пациентов 2 группы; 2) у пациентов 2 группы в 30,6% случаев в послеоперационном периоде детектировались повышенные уровни анти-Hsp60 антител по отношению к контролю; у всех анти-Hsp60 положительных пациентов наблюдались клинические осложнения послеоперационного течения; 3) между анти-Hsp60 положительными и анти-Hsp60 отрицательными пациентами 2 группы выявлено разницу по уровню ФНО-α: у анти-Hsp60 положительных пациентов на 8 сутки после операции уровень ФНО-α находился в пределах показателей контроля, тогда как у анти-Hsp60 отрицательных пациентов, данный показатель имел тенденцию к повышению в сравнении с контролем; 4) ФНО-α у пациентов первой группы на 8 сутки был достоверно выше контроля ($p=0,004$); 5) ИЛ-8 до операции во 2 группе выше чем в 1 й ($p=0,0039$); 6) ИЛ-10 у пациентов 1 группы выше, чем во 2 группе до операции ($p=0,002$) и ниже в 1 сутки после операции ($p=0,0001$).

Таким образом полученные нами результаты могут указывать на снижение регуляторной и защитной активности организма при переливании донорской крови. Аутологичная пуповинная кровь является функционально активной и не супрессирует иммунный ответ.

Литература:

1. *Yokota S., Minota S., Nobuhiro F.* Anti-HSP auto-antibodies enhance HSP-induced pro-inflammatory cytokine production in human monocytic cells via Toll-like receptors // Intern. Immun.- 2006.- **18**.-P.573-580.
2. *Mandal K., Jahangiri M., Mukhin M., Poloniecki J.,Camm J., Xu Q.* Association of anti-heat shock protein 65 antibodies with development of postoperative atrial fibrillation // Circulation. -2004.-V.110.-P.2588-2590.

INFLUENCE OF AUTOLOGOUS UMBILICAL CORD BLOOD TO THE IMMUNE REACTIVITY IN NEWBORNS WITH COMPLEX CONGENITAL HEART DISEASE

[1] Vorobeva G., [1]Tkachenko Y., [2] Yakovenko L., [1]Fedevich O., [1]Chasovsky K., [1] Tretiakova I., [2]Kapustian L., [2] Sidorik L., [1]Zhovnir V.

[1]Governmental institution "The Scientific-Practical Children's Cardiac Center of the Ministry of Health Care of Ukraine", Kyiv, Ukraine
[2]Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: yani_t2008@ukr.net

Surgical correction of critical congenital heart disease (CHD) using cardiopulmonary bypass (CPB) usually requires homologous blood transfusion. It's associated with risk of transmissible infections and immunological complications, especially in neonates. Autologous umbilical cord blood (AUCB), which contains biologically active substances, is an alternative source of blood. But using of AUCB in open cardiac surgery has not been applied. An important task is to find markers of safety and effectiveness of AUCB transfusion in neonatal cardiac surgery. Recently, much attention has been devoted to the role of molecular chaperones, especially heat shock protein 60 (Hsp60) and antibodies to Hsp60 in the pathogenesis of cardiovascular diseases. It was shown that anti-Hsp60 antibodies can increase the inflammatory response induced by extracellular Hsp60, including the production of proinflammatory cytokines [1]. The relationship between a preoperative rate of circulating anti-Hsp60 antibodies in adult patients with heart surgery and the development of postoperative atrial fibrillation was established [2]. Anti-Hsp60 reactivity and proinflammatory cytokines production after transfusion of AUCB during CPB aren't investigated.

We compared clinical data with serum level of anti-Hsp60 antibodies and inflammatory cytokines in neonates with transposition of the great arteries that underwent arterial switch operation using AUCB or homologous blood components. The first group included 12 neonates which were operated at the first 2-6 hours after birth with using of AUCB. The second group consisted of 25 neonates that were operated at 2-7 days after birth using homologous blood components. The control group consisted of 20 clinically healthy neonates.

The following features were observed in studied patients postoperatively: 1) pulmonary complications and fiver were only in patients from the second group; 2) 30,6% patients of the second group had increased levels of anti-Hsp60 antibodies in compare to control; in all anti-Hsp60 positive patients clinical complications were observed postoperatively; 3) serum level of TNF-α in anti-Hsp60 positive patients on the 8th day after surgery did not differ significantly from control ranges; in anti-Hsp60 negative patients, this index tended to increase compared with the control ranges, 4) serum level of TNF-α in patients of the first group on the 8th day after surgery was significantly higher than control ranges($p = 0,004$), 5) serum level of IL-8 before surgery was significantly higher in the second group comparing the first group ($p = 0,0039$), 6) preoperatively serum level of IL-10 was significantly higher in the first group comparing the second group ($p = 0,002$) and significantly lower on the 1th day after surgery ($p = 0,0001$).

Our preliminary results suggest that homologous blood transfusion is accompanied by the reduction of regulatory and protective activity of the organism. We did not identify any immunosuppression after autologous umbilical cord blood transfusion.

References:

1. *Yokota S., Minota S., Nobuhiro F.* Anti-HSP auto-antibodies enhance HSP-induced pro-inflammatory cytokine production in human monocytic cells via Toll-like receptors // Intern. Immun.- 2006.- **18**.-P.573-580.
2. *Mandal K., Jahangiri M., Mukhin M., Poloniecki J.,Camm J., Xu Q.* Association of anti-heat shock protein 65 antibodies with development of postoperative atrial fibrillation // Circulation. -2004.-V.110.-P.2588-2590.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ 11-ДЕЗОКСИМИЗОПРОСТОЛА НА ГОРМОНАЛЬНЫЙ ФОН НЕБЕРЕМЕННЫХ КРЫС

Габдрахманова С.Ф., Сапожникова Т.А., Басченко Н.Ж., Зарудий Ф.С., Иванова Н.А.

Учреждение Российской академии наук Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия. e-mail: newpharm@anrb.ru

Большое значение в акушерско-гинекологической практике имеют данные о роли простагландинов в репродукции человека. Особенно важно детальное выяснение взаимосвязанных гормональных процессов, регулирующих репродуктивный цикл. Целью нашей работы было выяснение влияния 11-дезоксимизопростола, синтезированного в лаборатории СНБ ИОХ УНЦ РАН на гормональные процессы, регулирующие эстральный цикл.

В серии опытов нами было изучено влияние 11-дезоксимизопростола на эстральный цикл крыс с 4-5 дневным эстральным циклом и массой тела 180-200 г. 11-дезоксимизопростол и мизопростол (cytotec, Pfizer) вводили перорально, в течение 21 дня в дозе 50 мкг/кг. По окончании опыта в сыворотке крови и инкубатах яичников определяли уровень половых и гипофизарных гормонов, методом иммуноферментного анализа. [1, 2]

При длительном введении 11-дезоксимизопростола наблюдалось снижение уровня эстрадиола в инкубатах яичников в 1,2 ($P<0.05$) и в 1,4 раза ($P>0.05$) по сравнению с мизопростолом и интактным контроле. Уровень остальных гормонов как в инкубатах яичников, так и в сыворотке крови повышался.

Уровень пролактина в инкубатах яичников крыс увеличился в 1,3 и в 1,5 раза по сравнению с группами мизопростола и интактного контроля соответственно, а уровень лютеинизирующего гормона увеличился соответственно в 1,4 и в 1,2 раза по сравнению с группами мизопростола и интактного контроля (табл 1).

Таблица 1. Гормональный фон в инкубатах яичников небеременных крыс (n=6)

Группа	Эстрадиол, пмоль/л	Пролактин, мкг/л	ХГ, мМЕ/мл	ФСГ, МЕ/л	ЛГ, МЕ/л
Контроль	169,0±19,1	0,40±0,06	0,32±0,04	0,040±0,021	0,62±0,02
Мизопростол (50 мкг/кг)	156,0±6,7	0,46±0,11	0,30±0,06	0,080±0,042	0,54±0,13
11-des (50 мкг/кг)	125,0±10,5#	0,60±0,17	0,34±0,11	0,100±0,021	0,74±0,19

N – количество животных в группах

- достоверно по отношению к мизопростолу

В сыворотке крови 11-дезоксимизопростол и мизопростол увеличивали уровень хорионического гонадотропина в 3,6 и 4 раза, а также уровень лютеинизирующего гормона в 2,2 раза по сравнению с контролем ($P<0.05$). В группе 11-дезоксимизопростола уровень фолликулостимулирующего гормона составил 0,12±0,001 МЕ/л, ($P<0.05$), а в группе мизопростола и контроля данный гормон отсутствовал. В группе 11-дезоксимизоростола уровень пролактина был в 1,3 и в 1,4 раза выше, чем в группах мизопростола и интактного контроля. В группе 11-дезоксимизопростола уровень эстрадиола был аналогичен контрольному, и выше по сравнению с группой мизопростола в 1,2 раза

Результаты экспериментального исследования показывают, что 11-дезоксимизопростол при длительном введении влияет на гипофиз, повышая уровень гонадотропных гормонов, при этом снижая уровень эстрадиола в яичниках, задерживая фазу овуляции у небеременных крыс.

Литература:

1. *В.В. Корхов, М.Н. Мац, Н.П. Панкрашкина и др.*, Акушерство и гинекология, **3**(7), 25-26, 1992
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, Р.У. Хабриева (ред), Москва, 2005
3. *Абрамченко В.В., Богдашкин Н.Г.* Простагландины и репродуктивная система женщины, Киев, "Здоровье", 180 с., 1988

EXPERIMENTAL STUDY OF THE INFLUENCE OF 11-DEOXIMIZOPROSTOLA ON HORMONAL PREGNANT RATS

Gabdrakhmanova S.F., Sapozhnikova T.A., Baschenko N.J., Zarudi F.S., Ivanova N.A.

Institute of Organic Chemistry, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Science, Ufa, Russia
e-mail: newpharm@anrb.ru

Great importance in obstetric practice have data on the role of prostaglandins in human reproduction. It is particularly important detailed elucidation of interrelated hormonal processes that regulate the reproductive cycle.

The aim of our study was to clarify the effect of 11-deoxsimizoprostol synthesized in the laboratory synthesis of low molecular weight bioregulators on the hormonal processes that regulate the estrous cycle. In a series of experiments, we studied the effect of 11-deoximizoprostol on estrous cycle in rats with 4-5 days of the estrous cycle and body weight 180-200 g. 11-deoximizoprostol and misoprostol (cytotec, Pfizer) was administered per os for 21 days at a dose of 50 μg / kg.

At the end of the experiment in the serum and ovarian incubates determined the level of sex and pituitary hormones, by enzyme immunoassay. [1, 2], prolonged administration 11 - deoximizoprostol observed decrease in estradiol levels in ovarian incubates 1.2 ($P < 0.05$) and 1.4 times ($P > 0.05$) compared with misoprostol and an intact control. The level of the other hormones both in the ovarian incubates, and in the serum increased. Prolactin levels in ovarian incubates of rats increased in 1,3 and 1,5 times in comparison with group of misoprostol and the intact control, respectively, and the level of luteinizing hormone increased respectively by 1,4 and 1,2 times in comparison with groups of misoprostol and an intact control (Table 1).

Table 1. Hormonal background in incubators ovarian nonpregnant rats (n = 6)

Groups	Estradiol, pmol / l	prolactin, μg/l	hCG, mME/ml	FSH, IU /l	LH, IU /l
Control	169,0±19,1	0,40±0,06	0,32±0,04	0,040±0,021	0,62±0,02
Misoprostol (50 μg / kg)	156,0±6,7	0,46±0,11	0,30±0,06	0,080±0,042	0,54±0,13
11-des (50 μg / kg)	125,0±10,5#	0,60±0,17	0,34±0,11	0,100±0,021	0,74±0,19

N - number of animals in the groups

- significantly relative to misoprostol

In serum 11-deoximizoprostol and misoprostol increased the level of human chorionic gonadotropin at 3.6 and 4 times, and the level of luteinizing hormone by 2,2 times compared with controls ($P < 0.05$). In the group of 11-deoximizoprostol follicle-stimulating hormone level was 0,12 ± 0,001 IU / L, ($P < 0.05$), and both in the misoprostol group and the control of this hormone is absent. In the group of 11-deoximizorostol prolactin level was 1,3 and 1,4 times higher than in the misoprostol group and intact control. In the group of 11-deoximizoprostol estradiol level was similar to the control, and higher compared with a group of misoprostol in 1,2 times

The experimental results show that the 11-deoxsimizoprostol prolonged administration affects the pituitary, increasing gonadotropin-releasing hormone, thus reducing the level of estradiol ovaries delaying the phase of ovulation in nonpregnant rats.

References:

1. *VV Korhogo, MN Matz, NP Pankrashin et al,* Obstetrics and Gynaecology, 3 (7), 25-26, 1992
2. Guide to experimental (preclinical) study of new pharmacological agents, RU Habrieva (ed.), Moscow, 2005
3. *Abramchenko VV, Bogdashkin NG* Prostaglandins and the female reproductive system, Kiev, "Health," 180., 1988 Influence experimental research 11-dezoksimizoprostola on a hormonal background of not pregnant rats

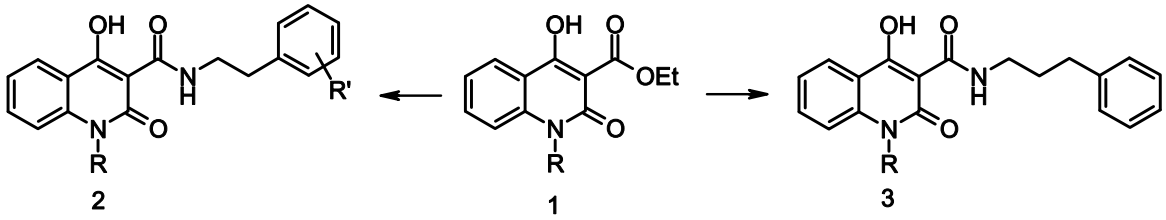
ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ СВЯЗИ "СТРУКТУРА – ДИУРЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ" В РЯДУ АМИДИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1-R-4-ГИДРОКСИ-2-ОКСО-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИН-3-КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Голик Н.Ю., Украинец И.В., Кравченко В.Н.

Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина
e-mail: uiv@kharkov.ua; uiv-2@mail.ru

Диуретики заслуженно относятся к жизненно важным лекарственным средствам. Уже много лет препараты этой фармакологической группы традиционно применяют при острых отравлениях, почечной или сердечной недостаточности и отеках мозга. Однако в последнее время перечень показаний для клинического использования диуретических средств значительно расширился и теперь их все чаще с успехом применяют в областях, на первый взгляд, никак не связанных с необходимостью усиленного мочевыделения – онкологии, трансплантологии, а также при лечении таких заболеваний, как муковисцидоз или эпилепсия. В связи с тем, что потребность в диуретиках со стороны практической медицины постоянно растет, поиск новых веществ с этим видом фармакологической активности и создание на их основе лекарственных средств, отвечающих современным требованиям к эффективности и безопасности, остается актуальной задачей медицинской химии.

Хинолин, как основа соединений, способных усиливать мочевыделительную функцию почек, еще совсем недавно считался абсолютно бесперспективным. Вместе с тем, проведенные нами широкие скрининговые исследования по изучению биологических свойств многочисленных 2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксамидов позволили выявить среди них и активные диуретики, превышающие по специфическому действию известные лекарственные препараты при значительно более низкой токсичности [1, 2]. Продолжая исследования в данном направлении, а также с целью выявления новых структурно-биологических закономерностей взаимодействием этиловых эфиров хинолин-3-карбоновых кислот **1** с арилалкиламинами в кипящем этиловом спирте нами осуществлен синтез, а затем изучены биологические свойства соответствующих 2-арилэтил- (**2**) и 3-фенилпропил- (**3**) амидов 1-R-4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновых кислот:



1-3: R = H, C_1-C_5 Alk, All; R' = H, 4-Cl, 4-OMe, 3,4-$(OMe)_2$

Все полученные хинолин-3-карбоксамиды **2** и **3** представляют собой бесцветные кристаллические вещества с четкими температурами плавления, при комнатной температуре растворимые в ДМФА и ДМСО, мало растворимые в спиртах и практически нерастворимые в воде. Их строение подтверждено спектрами ЯМР ^{1}H.

Диуретические свойства всех синтезированных арилалкиламидов **2** и **3** изучали на беспородных белых крысах весом 180-200 г по стандартной методике. Исследуемые вещества вводили перорально в дозе 20 мг/кг в виде тонкой водной суспензии, стабилизированной твином-80. Препарат сравнения – гидрохлортиазид – использовали в его эффективной дозе (40 мг/кг), диурез регистрировали через 4 часа.

Анализ полученных при этом данных показывает, что с переходом от бензиламидов 1-R-4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновых кислот к 2-арилэтильным **2** или 3-фенилпропильным **3** аналогам мочегонное действие существенно падает. Говоря иначе, получено еще одно экспериментальное подтверждение сделанного нами ранее вывода о негативном влиянии на диуретическую активность 1-R-4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоксамидов удаления ароматического кольца от амидного атома азота. Тем не менее, все же удалось выявить несколько вполне неожиданных исключений из этого правила. Так, в частности, 4-метоксифенилэтиламид 1-этил-4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновой кислоты (**2**, R= Et, R' = 4-OMe) и, что более интересно, 3-фенилпропиламиды 1H- и 1-этил-замещенных 4-гидроксихинолин-3-карбоновых кислот (**3**, R = H и Et) продемонстрировали довольно выраженное усиление мочевыделительной функции почек.

Литература:

1. *Ukrainets I.V., Mospanova E.V., Bereznyakova N.L., Naboka O.I.* Synthesis and study of structure – biological activity relationships in a series of 1-hydroxy-3-oxo-5,6-dihydro-3H-pyrrolo[3,2,1-*ij*]quinoline-2-carboxylic acid anilides // Chem. Hetero-cycl. Comp. 2007. Vol. 43. N 12. P. 1532-1539.
2. *Ukrainets I.V., Bereznyakova N.L., Parshikov V.A., Naboka O.I.* 4-Methyl-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acid anilides as potential diuretics // Chem. Heterocycl. Comp. 2008. Vol. 44. N 2. P. 178-183.

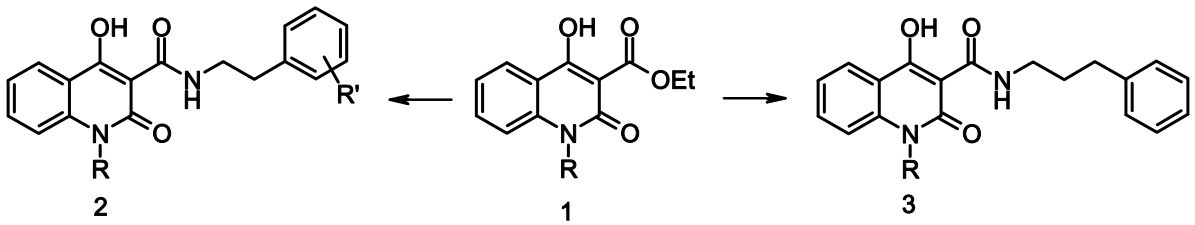
THE STUDY OF REGULARITIES OF THE "STRUCTURE – DIURETIC ACTIVITY" RELATIONSHIP IN THE RANGE OF 1-R-4-HYDROXY-2-OXO-1,2-DIHYDROQUINOLINE-3-CARBOXYLIC ACIDS AMIDATED DERIVATIVES

Golik N.Yu., Ukrainets I.V., Kravchenko V.N.

National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine
e-mail: uiv@kharkov.ua; uiv-2@mail.ru

Diuretics justly belong to vitally important medicines. For many years medicines of this pharmacological group are traditionally used in acute poisonings, renal or cardiac insufficiency and brain's edemas. However, recently the list of indications for clinical application of diuretics has been significantly expanded and at present they are often successfully used in the areas, which, at first sight, are not related to the necessity of hyperuropoiesis – oncology, transplantology, as well as in the treatment of such diseases as mucoviscidosis or epilepsy. Since the need in diuretics has been constantly growing in practical medicine, the search of new substances with this type of the pharmacological activity and creation of medicines based on them, which correspond to modern requirements of efficiency and safety, remains the actual task of medical chemistry.

Quinoline, as a base of compounds, which are capable of intensifying the urinary excretion of kidneys, has been considered to be practically prospectless until quite recently. However, the extensive screening in studying biological properties of numerous 2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxamides carried out by us allowed to reveal active diuretics among them with the specific action, which is higher than that the known medicines have, and less toxic [1, 2]. To continue our research and to find out new structural biological regularities we have carried out the synthesis of the corresponding 2-arylethyl- (**2**) and 3-phenylpropyl- (**3**) amides of 1-R-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acids by the interaction of ethyl esters of quinoline-3-carboxylic acids **1** with arylalkylamines in boiling ethyl alcohol, and then their biological properties have been studied:



1-3: R = H, C_1-C_5 Alk, All; R' = H, 4-Cl, 4-OMe, 3,4-$(OMe)_2$

All quinoline-3-carboxamides **2** and **3** obtained are colourless crystalline substances with distinct melting temperatures, soluble in DMF and DMSO at the room temperature, poorly soluble in alcohols and practically insoluble in water. Their structure was confirmed by NMR ^{1}H spectra.

Diuretic properties of all arylalkylamides **2** and **3** synthesized were studied in outbred white rats with the body weight of 180-200 g using the standard method. The substances under research were introduced orally in the dose of 20 mg/kg in the form of thin aqueous suspension stabilized by TWEEN-80. The reference medicine – hydrochlorothiazide – was used in its effective dose (40 mg/kg), diuresis was monitored in 4 h.

Analysis of the data obtained shows that the diuretic effect significantly decreases with transfer of benzylamides of 1-R-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acids to 2-arylethylic **2** or 3-phenyl-propylic **3** analogues. In other words, another experimental confirmation of the conclusion previously made by us about a negative effect of the aromatic ring removal from the amide atom of nitrogen on the diuretic activity of 1-R-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxamides has been received. However, we succeeded in revealing some quite unexpected exceptions from the rule. In particular, 4-мethoxyphenylethylamide of 1-ethyl-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acid (**2**, R= Et, R' = 4-OMe) and, it is more interesting, 3-phenyl-propylamides of 1H- and 1-ethyl-substituted 4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acids (**3**, R = H and Et) showed rather expressed intensification of the renal urinary excretion.

References:

1. *Ukrainets I.V., Mospanova E.V., Bereznyakova N.L., Naboka O.I.* Synthesis and study of structure – biological activity relationships in a series of 1-hydroxy-3-oxo-5,6-dihydro-3H-pyrrolo[3,2,1-*ij*]quinoline-2-carboxylic acid anilides // Chem. Hetero-cycl. Comp. 2007. Vol. 43. N 12. P. 1532-1539.
2. *Ukrainets I.V., Bereznyakova N.L., Parshikov V.A., Naboka O.I.* 4-Methyl-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acid anilides as potential diuretics // Chem. Heterocycl. Comp. 2008. Vol. 44. N 2. P. 178-183.

РЕКТАЛЬНИЙ ЗАСІБ ВВЕДЕННЯ СИНТЕТИЧНИХ ПЕПТИДІВ ТИМУСА У РАННЬОМУ ВІЦІ

Гончарова Н.Г., Бессараб Г.І., Сухомлінова І.Є., Сухомлінов В.М.

Запорізький державний медичний університет, Запоріжжя, Україна
e-mail: edelweiss57@ukr.net; edelweiss57@ukr.net

Відомо, що в клінічній практиці хворих дітей грудного віку завжди більш привабливішими виглядають не травматичні способи введення лікарських препаратів. Стосується такий підхід і до біологічно активних речовин – синтетичних похідних зобної залози. Традиційно імунокорекцію проводять парентерально, але з огляду на інвазивність такої терапії та складність при набиранні в шприць одноразової дози тимомиметика, яка складає декілька мікрограм, ми звернулися до ректального способу введення препарату. Привабливість використання тимогена в ректальних супозиторіях визначалася не болючістю методу введення ліки, стійкістю препарату у мазьових лікарських формах, зручністю дозування, активнішою і тривалішою дією тимогену в лужному середовищі лімфи при контакті з «Т-клітинами-мішенями».

Ректальні свічки виготовлялися індивідуально для кожної хворої дитини на кафедрі технології лікарських засобів Запорізького державного медичного університету згідно з рецептурним прописом лікарської форми, технологічними стандартами виготування та контролем якості за виливанням дитячих супозиторіїв [1]. Для парентерального застосування та виготовлення свічок ми використовували препарат тимоген в ампулах по 1мл 0,01% розчину для внутрішньо-м'язового введення (виробництва ЦИТОМЕД, Санкт-Петербург).

Імунокорекцію проводили за клініко-імунологічними показаннями у віковій терапевтичній дозі на протязі 7 днів, 1 раз на добу. Першій групі спостереження тимоген вводили традиційно – внутрішньом'язово, 2-й – у вигляді ректальних свічок. Аналіз результатів імунокорекції у 1-й групі хворих виявив, порівняно з вихідними даними, підвищення на 19,7% відсоткового вмісту Т-лімфоцитів і на 36,5% - чутливих до теофіліну Т-лімфоцитів ,зниження на 48,1% абсолютної кількості О-лімфоцитів ($p<0,05$). У 2-й групі дітей, відносно вихідних показників, на 22,9% підвищився рівень сироваткового імуноглобуліну G, на 17,4% зросло фагоцитарне число ($p<0,05$), на 30,9% знизилася активність компліменту, на 36,9% - відносного вмісту моноцитів і на 25% - рівня сироваткового імуноглобуліну А, ($p<0,05$). При порівнянні результатів імунотерапії з'ясувалося, що при ректальному способі введення тимогену, порівняно з парентеральним, встановлено підвищення відсоткового вмісту лімфоцитів на 29,3%, фагоцитарного числа - на 18,8% ($p<0,05$), що виявляє можливості впливу препарату не тільки на клітинну ланку адаптивного імунітету, але й на на механізми вродженої резистентності.

Таким чином, не залежно від засобу введення тимогена з метою імунокорекції, виявлено його імуномоделюючу дію.

Література:

1.Головкин В.А., Ткаченко Ю.П. Детские ректальные суппозитории. – Запорожье : издат. Запорож. ин-та, 1993. – 29 с.

THE RECTAL ADMINISTRATION OF SYNTHETIC PEPTIDES OF THYMUS IN INFANTS

Goncharova N.G., Bessarab G.I., Suchomlinova I.E., Suchomlinov V.M.

Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine
e-mail: edelweiss57@ukr.net; edelweiss57@ukr.net

It is known that the not traumatic method of drugs use is more attractive than traumatic in clinical practice of infants. This regulation is attractive for medicine of biologically active substances – synthetic derivatives of thymus too.Traditionally we can see immunocorrection in parenteral forms but there are many hardships take place during this treatment such as painfulness and complexity when you want to type a single dose of drug in syringe, which is a few micrograms. For this reason we used the rectal route of administration of the drug. The attractiveness of mode of timogen administration in rectal suppositories was determined. They are not painful of this method, the drug' high resistance in pharmaceutical ointment forms, convenience to dose of timogen , the very active and long-term action of timogen to T-target cells in alkaline environment of the lymph.

The rectal suppositories were made individually for each sick child at the Department of Technology medicines of Zaporozhye State Medical University in accordance with the drug form prescription in words technological standards, control of quality for children suppositories pouring[1]. We used the 0.01% timogen in ampoules (1ml, production CITOMED, St.Petersburg) for parenteral injections and rectal suppositories making.

Immunocorrection performed with clinical and immunological indications of therapeutic age dose within 7 days, 1 time per a day. Timogen were injected traditionally -intramuscularly for the first observation group and - in rectal suppositories for the second one. Analysis of immunotherapy results showed to T lymphocytes increase by 19,7% and theophyllin sensitive T-lymphocytes by 36,5% too and to lymphocytes absolute number decrease by 48,1% in the 1-group of patients, compared with baseline (p <0,05).The serous level of immunoglobulin G increased by 22,9% (p <0,05), the phagocytic number rose by 17,4% (p <0,05);the level of compliment activity decreased by 30,9%(p <0,05) , the relative content of monocytes -by 25% % (p <0,05) and level of immunoglobulin A–by36, 9%(p <0,05) in the second group of children against initial indicators. The increasing percentage of lymphocytes (by 29.3%; p <0, 05) and phagocytes number - by 18,8% (p <0,05) were in timogen rectal way of introduction , compared with parenteral. We detect possible effects of the drug not only on the cellular part of adaptive immunity, but also on the mechanisms of innate resistance.

Thus, the immunomodulatory action of timogen took place at the different ways of the drug administration.

References:

1. *Golovkin V.A., Tkachenko U.P.* The rectal suppositories for children. – Zaporozhye:Zaporozhye State Medical University, 1993. – 29 p.

ЗМІНИ ЛІПІДНОГО СКЛАДУ ЖОВЧІ СОБАК ПІД ВПЛИВОМ ПРОСТАГЛАНДИНУ $F_{2\alpha}$

Горенко З.А., Карбовська Л.С., Весельський С.П., Бабан В.М.

НДІ фізіології імені академіка Петра Богача ННЦ «Інститут біології»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail: geminiz@ukr.net

В хронічних дослідах на безпородних собаках з вживленою за методикою Лященка [1] У-подібною комбінованою холецисто-дуоденальною фістульною трубкою при двічі перев'язаній і перерізаній загальній жовчній протоці вивчали вплив простагландину $F_{2\alpha}$ на жовчоутворювальну функцію печінки. Спроби проводили на голодних (18-20 годин після останньої годівлі) тваринах в один і той же час доби - з 10 до 14 години. В дослідах враховували кількість виробленої печінкою жовчі за кожні 30 хв впродовж 3 годин секреції. Простагландин $F_{2\alpha}$ в дозі 1 мкг/кг вводили внутрішньодуоденально в 5 мл H_2O dest (pH 7,34-7,36). Контролем слугували досліди із внутрішньодуоденальним введенням відповідного об'єму та pH дистильованої води. Кількість та хімічний склад жовчі, одержаної в дослідах із застосуванням простагландину $F_{2\alpha}$, порівнювали з такими контрольних спроб. Різниця в показниках рівня холерезу і якісного складу жовчі дозволяла оцінювати холеретичний ефект простагландину $F_{2\alpha}$. Вміст ліпідних складових жовчі визначали за допомогою розробленого нами способу [2].

Результати наших досліджень показали, що простагландин $F_{2\alpha}$ незначно змінював рівень секреції жовчі. На фоні невірогідних змін об'ємної швидкості жовчоутворення під впливом простагландину $F_{2\alpha}$ спостерігались статистично значущі зміни концентрацій фосфоліпідів, холестеролу та його ефірів, вільних жирних кислот (табл.1). Так концентрація останніх впродовж трьох годин досліду була меншою контролю.

Таблиця 1 - Зміни концентрації (мг%) ліпідних складових в жовчі собак під впливом простагландину F2α (M±m; n=37); * - (p<0,05); ** - (p<0,01); * - (p<0,001) щодо контролю**

30-хв проміжки часу	Серія дослідів	Вільний холестерол	Ефіри холестеролу	Фосфоліпіди	Вільні жирні кислоти
1	Контроль	48,9±1,47	12,2±0,63	213,7±5,4	61,8±1,91
	Простагландин	50,0±1,44	12,0±0,44	214,0±3,5	59,3±2,10
2	Контроль	48,1±1,28	11,6±0,55	208,3±5,2	61,4±1,77
	Простагландин	52,3±1,51	13,3±0,44*	225,9±3,4**	53,8±1,97**
3	Контроль	45,0±1,11	10,6±0,55	200,7±5,8	59,6±1,92
	Простагландин	54,9±1,47***	14,9±0,44***	236,6±3,1***	49,8±1,93**
4	Контроль	43,7±1,33	9,7±0,42	195,9±5,1	57,2±2,03
	Простагландин	52,5±1,37***	15,4±0,43***	223,7±2,9***	49,3±1,75**
5	Контроль	41,5±1,07	9,2±0,42	188,7±5,4	54,5±2,28
	Простагландин	49,2±1,47***	13,5±0,45***	215,6±2,9***	51,6±1,92
6	Контроль	44,2±1,24	8,6±0,39	186,2±5,3	52,8±2,26
	Простагландин	49,4±1,51***	12,8±0,28***	219,8±3,6***	51,3±2,33

Зміни концентрації фосфоліпідів мали протилежну спрямованість. Міліграмвідсотковий вміст цього компоненту жовчі впродовж всього досліду із застосуванням простагландину перевищував контрольні показники. Подібна динаміка спостерігалась і в змінах концентрації вільного та етерифікованого холестеролу. Такий перерозподіл співвідношення вільного холестеролу та його ефірів призвели до зростання коефіцієнта етерифікації у дослідах із застосування простагландину. Так в жовчі контрольних дослідів відсоток вільного холестеролу з перебігом спроби зростає (з 80,0 на початку до 83,7 наприкінці досліду), а етерифікованого поступово зменшується (з 20,0 до 16,3), внаслідок чого зменшуються і значення коефіцієнта етерифікації. Після застосування простагландину $F_{2\alpha}$ концентрації як вільного, так і етерифікованого холестеролу перевищують контрольні значення впродовж всього досліду. Проте відсоткове співвідношення між вільним холестеролом та його ефірами мало змінюється впродовж всього досліду. Відповідно і значення коефіцієнта етерифікації з перебігом спроби перевищують значення у контролі, проте впродовж досліду значних коливань цього показника не відмічається. Такі результати свідчать про те, що простагландин $F_{2\alpha}$ посилює інтенсивність процесів етерифікації вільного холестеролу.

Таким чином результати наших досліджень свідчать, що у собак в умовах хронічного експерименту простагландин $F_{2\alpha}$ в дозі 1,0 мкг/кг при внутрішньодуоденальному застосуванні не змінює об'єм секретованої жовчі, проте збільшує концентрацію холестеролу, його ефірів та фосфоліпідів, що в цілому покращує солюбілізуючі властивості жовчі.

Література:

1. *Лященко П.С.* К методике исследования внешнесекреторной функции печени у собак // Физиол.журн.СССР.-1975. - Т.61, № 12. - С.1891-1893. 2 Патент 33564 А Україна, МПК А 61В 5/14. Спосіб підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи / Весельський С.П., Лященко П.С., Костенко С.І., Горенко З.А., Куровська Л.Ф.; заявник та власник патенту Київський університет імені Тараса Шевченка - № 99031324; заявл.11.03.99; опубл.15.02.2001, Бюл.№ 1.

DOG BILE LIPID COMPONENT CHANGES UNDERTHE INFLUENCE OF PROSTAGLANDIN $F_{2\alpha}$

Gorenko Z.A., Karbovska L.S., Veselsky S.P., Baban V.M.

Peter Bogach Institute of Physiology, Teaching and research centre "Institute of biology",
Taras Shevchenko National University of Kyiv
e-mail: geminiz@ukr.net

In chronic experiments on outbred dogs with implanted Y(-type) combined cholecysto-duodenal fistula by Lyaschenko's method [1] at the twice ligated and transected common bile duct we investigated the effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on liver bile formation function. Experiments conducted on hungry (18-20 hours after the last feeding) animals at the same time – from 10 to 14 hour. In experiment we considered an amount of liver bile every 30 min during 3 hour of secretion. We inject prostaglandin $F_{2\alpha}$ (1 mkg/kg) intra duodenum in 5 ml of H_2O dest (pH 7,3-7,4). In control experiments we inject distilled water with the proper volume and pH. Amount and chemical composition of bile after prostaglandin $F_{2\alpha}$ administration compared to such control attempts. The difference in bile flow and qualitative content variables of the bile permits to evaluate choleretic effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$. Content of bile lipid component was determined by the method developed by us [2].

Our results demonstrate that prostaglandin $F_{2\alpha}$ insignificantly changed the level of bile secretion. Against a background the invalid changes of bile flow rate at the influence of prostaglandin $F_{2\alpha}$ observed statistically significant changes of phospholipids, cholesterol, cholesterol esters and free fatty acids concentrations (Tabl.1). So a free fatty acids concentration was less than control during 3 hours of experiment.

Table 1 – Lipid composition (mg%) of dog bile at the influence of prostaglandin $F_{2\alpha}$ (M±m; n=37); * - (p<0,05); ** - (p<0,01); * - (p<0,001) when compared to control.**

30-min interval	Run	Free cholesterol	Cholesterol ethers	Phospholipids	Free fatty acids
1	Control	48,9±1,47	12,2±0,63	213,7±5,4	61,8±1,91
	Prostaglandin $F_{2\alpha}$	50,0±1,44	12,0±0,44	214,0±3,5	59,3±2,10
2	Control	48,1±1,28	11,6±0,55	208,3±5,2	61,4±1,77
	Prostaglandin $F_{2\alpha}$	52,3±1,51	13,3±0,44*	225,9±3,4**	53,8±1,97**
3	Control	45,0±1,11	10,6±0,55	200,7±5,8	59,6±1,92
	Prostaglandin $F_{2\alpha}$	54,9±1,47***	14,9±0,44***	236,6±3,1***	49,8±1,93**
4	Control	43,7±1,33	9,7±0,42	195,9±5,1	57,2±2,03
	Prostaglandin $F_{2\alpha}$	52,5±1,37***	15,4±0,43***	223,7±2,9***	49,3±1,75**
5	Control	41,5±1,07	9,2±0,42	188,7±5,4	54,5±2,28
	Prostaglandin $F_{2\alpha}$	49,2±1,47***	13,5±0,45***	215,6±2,9***	51,6±1,92
6	Control	44,2±1,24	8,6±0,39	186,2±5,3	52,8±2,26
	Prostaglandin $F_{2\alpha}$	49,4±1,51***	12,8±0,28***	219,8±3,6***	51,3±2,33

The changes of phospholipids concentration had an opposite direction. Content of this bile component exceeds control indexes during all period of experiment after application of prostaglandin $F_{2\alpha}$. Similar changes was observed to concentration of free and etherifying cholesterol. Redistribution ratio of free cholesterol and cholesterol ethers result in increase of etherification coefficient in experiments with application of prostaglandin $F_{2\alpha}$. In control experiments the percent of free cholesterol in bile increase (from 80,0 to 83,7) during experiment and cholesterol ethers progressive decreases (from 20,0 to 16,3), the values of etherification coefficient diminish as a result. The concentrations both free cholesterol and cholesterol ethers are exceeded control values during all experiment after application of prostaglandin $F_{2\alpha}$. However a percent relation of free cholesterol and cholesterol ethers little changes during all experiment. In accordance to the values of etherification coefficient exceeds a values in control, however considerable vibrations of this index no record during the experiment. These results evidence that prostaglandin $F_{2\alpha}$ increases intensity of etherification processes of free cholesterol. Thus, our results suggests, that prostaglandin $F_{2\alpha}$ at the dose of 1,0 mkg/kg after intraduodenal injection in the dogs chronic experiment does not changes the secrete bile volume, however increase the cholesterol, cholesterol ethers and phospholipids concentrations, that improves solubilization properties of bile integrally.

References:

1.*Лященко П.С.* К методике исследования внешнесекреторной функции печени у собак // Физиол.журн.СССР.-1975. - Т.61, № 12. - С.1891-1893. 2 Патент 33564 А Україна, МПК А 61В 5/14. Спосіб підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи / Весельський С.П., Лященко П.С., Костенко С.І., Горенко З.А., Куровська Л.Ф.; заявник та власник патенту Київський університет імені Тараса Шевченка - № 99031324; заявл.11.03.99; опубл.15.02.2001, Бюл.№ 1.

ГЕНІПІН ІНГІБУЄ АКТИВНІСТЬ ІНДУЦИБЕЛЬНОЇ СИНТАЗИ ОКСИДУ АЗОТУ І ПРИГНІЧУЄ ВІДНОВЛЕННЯ ФУНКЦІЇ СЕРЦЯ СТАРИХ ЩУРІВ ПРИ ІШЕМІЇ-РЕПЕРФУЗІЇ

Гошовська Ю.В., Шиманська Т.В., Коркач Ю.П., Сагач В.Ф.

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ, Україна
e-mail: pokutt@gmail.com

Відомо, що старіння супроводжується порушенням діастолічної функції серця, в основі якої лежить дисфункція мітохондрій, пов'язана зі зниженням спряження використання кисню з продукцією АТФ. Крім того з віком знижується резистентність міокарда до дії такого пошкоджуючого агента як ішемія-реперфузія, основною причиною чого вважається інтенсифікація вільнорадикальних процесів, окислення макромолекул і зниження ефективності антиоксидантного захисту. Тому з метою запобігання розвитку порушень функції серця з віком перспективним є застосування сполук з антиоксидантними властивостями.

При старінні відбуваються зміни в системі синтезу оксиду азоту (NO) – основної регуляторної молекули, що забезпечує регуляцію тонусу коронарних судин і розслаблення міокарда. З віком знижується активність конститутивної (cNOS) і підвищується активність індуцибельної (iNOS) синтази оксиду азоту, що супроводжується утворенням сильного окислювача – пероксинітриту. Однак, засобів, які б здійснювали коригуючий вплив на систему синтезу NO, сьогодні відомо не багато. Нещодавно стало відомо, що геніпін – сполука рослинного походження, похідне геніпозиду, виділеного з плодів Gardenia jasminoides, проявляє антиоксидантні властивості. На моделі ізольованого за методом Лангендорфа серця старих щурів вивчали зміни показників кардіодинаміки і кисневого метаболізму міокарда під дією ішемії-реперфузії, а також попереднього впливу геніпіну (Wako Inc., USA) на зазначені параметри і показники, що характеризують вільнорадикальні процеси і зміни в системі синтезу NO.

Слід зазначити, що ішемія-реперфузія значно пригнічувала скоротливу активність ізольованого серця старих щурів, що проявлялося в зниженні тиску у лівому шлуночку, підвищенні кінцево-діастолічного тиску, падінні коронарного потоку. При цьому значно збільшувалась киснева вартість роботи міокарда, швидкість генерації супероксидного радикалу (втричі), гідроксильного радикалу (в 2,5 рази), вмісту пероксиду водню (вдвічі), а також кінцевого продукту перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) – малонового диальдигіду (вдвічі).

Попередня перфузія коронарних судин геніпіном призводила до значного, навіть нижче значень у контрольній групі, зниження швидкості продукції АФК при ішемії-реперфузії. Також спостерігали значне зниження активності ферментів iNOS, аргінази і нітратредуктази. Водночас, активність cNOS зростала у два рази. Однак, такого компенсаторного збільшенням активності cNOS було не достатньо для відновлення діастолічної функції лівого шлуночка підчас реперфузії, оскільки швидкість розслаблення міокарда старих щурів була достовірно нижчою, ніж в контролі і не відновлювалась до кінця спостереження. Це вказує на нестачу NO у тканинах серця в постішемічний період,

Таким чином, геніпін проявляє антиоксидантні і антиліпопероксидативні властивості, а також демонструє регуляторний вплив на активність ферментів синтезу NO. Однак, надмірне пригнічення синтезу NO індуцибельною NOS може бути причиною недостатнього відновлення функції серця старих щурів у період реперфузії.

GENIPIN INHIBITS ACTIVITY OF iNOS AND DEPRESSES RESTORATION OF HEART FUNCTION DURING ISCHEMIA-REPERFUSION IN OLD RATS

Goshovska Y.V., Tshimanskaya T.V., Korkach Yu.P., Sagach V.F.

Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: pokutt@gmail.com

It is known that aging is accompanied by a diastolic heart function disturbances, that are based on mitochondrial dysfunction associated with decreased coupling of oxygen utilization with production of ATP. In addition, aging is accompanied by decreased myocardial resistance to ischemia-reperfusion and intensification of reactive oxygen species (ROS) generation, lipid peroxidation and decreased antioxidant protection. Therefore, application of compounds with antioxidant properties is a promising strategy to prevent ischemic damage of heart with age.

With aging there are changes in the synthesis of nitric oxide (NO) - the main regulatory molecule that provides the regulation of coronary tone and myocardial relaxation. Decreased activity of constitutive (cNOS) activity and increased activity of inducible (iNOS) nitric oxide synthase lead to formation of a strong oxidizer - peroxynitrite. However, measures that would effect the system of NO synthesis, not much is known today. Recently it was reported that genipin - compound of geniposide, extracted from the fruits of Gardenia jasminoides, exhibits antioxidant properties. We studied the effect of genipin (Wako Inc., USA) pretreatment on heart function restoration under ischemia-reperfusion at model of isolated heart by the Langendorf preparation in old rats. We registered parameters of cardiodynamics, estimated changes of oxygen metabolism of heart, free radicals processes and changes in the synthesis NO.

It should be noted that ischemia-reperfusion significantly depressed contractile activity of isolated heart of old rats. It was manifested by decrease in the left ventricle pressure, increase of end-diastolic pressure and coronary flow. Disturbances of heart function was accompanied by non effective oxygen utilization, namely significant increase of oxygen cost of myocardial work, superoxide radical generation (three times), hydroxyl radical (2,5 times), content of hydrogen peroxide (twice) and the end product of lipid peroxidation - malonic dialdygide (twice).

Pretreatment of isolated hearts with genipin resulted in significant, even lower than in the control, reducing of ROS generation during ischemia-reperfusion. Also we observed significant reduction of iNOS, arginaze and nitratreductase activities. However, cNOS activity increased twofold, such a compensatory increase in cNOS activity was not enough to restore the left ventricular diastolic function during reperfusion in genipin pretreated hearts, because the myocardial relaxation (dP/dt min) was significantly lower than in control and not recommenced until the end of observation. This indicates a lack of NO in heart tissues in postishemic period.

Thus, genipin shows antioxidant and antilipoperoxidative properties, and also shows the regulatory impact on the activity of NO enzymes. However, strong inhibition of NO synthesis by iNOS can cause poor restoration of heart function in old rats during reperfusion.

ЗМІНИ ІОННОГО СКЛАДУ ШЛУНКОВОГО СОКУ ПІД ВПЛИВОМ ТАУРИНУ У СОБАК

Грінченко О.А., Бабан В.М.

НДІ фізіології імені академіка Петра Богача ННЦ «Інститут біології»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail: olgrinch@ukr.net

Відомо, що таурин задіяний в підтриманні електричного заряду на мембранах клітин та є одним із регуляторів надходження і витоку з клітин іонів натрію, калію, кальцію і магнію [1,2]. Зміни концентрації цих іонів в секреторних клітинах шлункових залоз супроводжують процеси секреції шлункового соку. Так, процеси осмотичної фільтрації води в шлунку і секреції соляної кислоти парієтальними клітинами тісно пов'язані зі змінами концентрації іонів натрію і калію в клітинах слизової оболонки шлунка. За умов активації секреторного процесу відбуваються також зміни іонного складу шлункового соку. В наших експериментах таурин значно посилював шлункову секрецію, стимульовану гістаміном. Тому ми дослідили вплив таурину на концентрацію іонів натрію і калію в шлунковому соці, стимульованому гістаміном.

Дослідження проведені в умовах хронічного експерименту на безпородних собаках з фістулами шлунка після 18-ти годинної харчової депривації. У піддослідних тварин шлунковий сік збирали кожні 15 хвилин впродовж півтори години секреції. В кожній отриманій пробі шлункового соку визначали концентрацію іонів натрію і калію методом полум'яної фотометрії [3]. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою пакету програм «Статистика 6.0» з використанням t-критерію Стьюдента, оскільки дані мали нормальний розподіл при їх перевірці за допомогою тесту Шапіро-Уілка. Достовірними вважались відмінності між контролем і дослідом при $p<0,05$.

Результати наших досліджень показали, що під впливом таурину (1,4 мг/кг) концентрація іонів натрію в шлунковому соці підвищувалась на початку досліду при застосуванні амінокислоти за 15 хвилин до введення гістаміну (0,05 мг/кг, підшкірно), а концентрація іонів калію зменшувалась впродовж перших 60-ти хвилин досліду при введенні таурину як за 15 хвилин, так і за 2 години до застосування стимулятора (рис.1). Аналізуючи отримані нами результати слід зауважити, що найбільші зміни концентрації іонів натрію і калію в шлунковому соці спостерігались практично відразу після внутрішньошлункового введення таурину. Отже, має місце прямий вплив амінокислоти на секреторні клітини шлунка. Можна припустити, що таурин впливає на секреторну функцію шлунка, модулюючи метаболічні процеси в клітинах секреторних залоз.

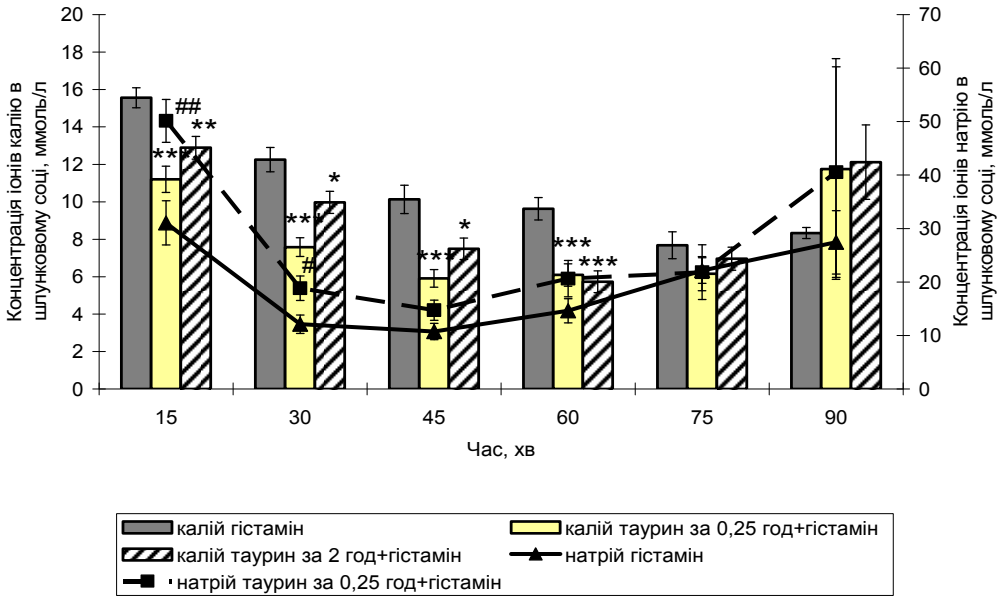


Рис.1. Вплив таурину (1,4 мг/кг) на концентрацію іонів натрію і калію в шлунковому соці, стимульованому гістаміном (0,05 мг/кг), у собак (M±m; n=64)

Література:

1. *Li F.* Taurine replacement attenuates hyperalgesia and abnormal calcium signaling in sensory neurons of STZ-D rats / Li F., Obrosova I.G., Abatan O. [et al.] // AJP: Endocrinol. Metab. - 2005. - V. 288. - P. E29-E36.
2. *Noulin J.F.* Two types of K channels at the basolateral membrane of proximal tubule: inhibitory effect of taurine / Noulin J.F., Brochiero E., Lapointe J.Y., Laprade R. // AJP: Renal. Physiol. - 1999. - V. 277, № 2. - P. F290-F297.
3. *Крешков А.П.* Основы аналитической химии 3 / Крешков А.П. - Москва: изд-во «Химия». - 1977. - С. 245-253.

THE ION CONTENT CHANGES OF GASTRIC JUICE AT THE INFLUENCE OF TAURINE IN DOGS

Grinchenko O.A., Baban V.M.

Peter Bogach Institute of Physiology ESC «Institute of Biology» of National Taras Shevchenko University of Kyiv, Kyiv, Ukraine
e-mail: olgrinch@ukr.net

It is known that taurine participates in supporting of membrane electric charge of cells and one of the regulators of influx and efflux of Na^+, K^+, Ca^{2+} and Mg^{2+} from cells [1,2]. The changes of these ion concentrations in secretory cells of gastric glands were accompanied with processes of gastric juice secretion. Processes of osmotic filtration and secretion of hydrochloric acid in the stomach were associates with Na^+ and K^+ concentration changes in gastric mucosal cells. The activation of secretory process cause changes of ion content of gastric juice too. In our experiments taurine significantly enhanced gastric secretion stimulated by histamine. Therefore we investigated the influence of taurine on Na^+ and K^+ ion concentration in gastric juice stimulated by histamine.

Researches were conducted in chronic experiments on dogs with gastric fistula tubes after 18 hour of food deprivation. Gastric juice was gathered every 15 minutes during one and a half hour of secretion. In every obtained sample of gastric juice we determined the Na^+ and K^+ ion concentrations by flaming photometry method [3]. Statistic processes of obtained data carry out by means of programs packet «Statistica 6.0» with used Student's t-criteria because data have normal distribution by their verification on Shapiro-Wilk's test. The differences between control and experiment considered reliable at $p<0,05$.

The results of our experiments shown that taurine (1,4 mg/kg) introduced 15 minutes before histamine injection (0,05 mg/kg, subcutaneously) increased the Na^+ concentration in gastric juice at the beginning of experiment and decreased the K^+ concentration during the first 60 minutes of experiment at the introduced both 15 minutes before and 2 hour before stimulator application (fig.1). The obtained data in our experiments suggests that the most significant changes of Na^+ and K^+ ion concentrations in gastric juice observed practically at once after intragastric application of taurine. Thus it is suggest on the direct influence of amino acid on gastric secretory cells. It is possible that taurine influence on gastric secretory function by modulation of metabolic processes in secretory glands cells.

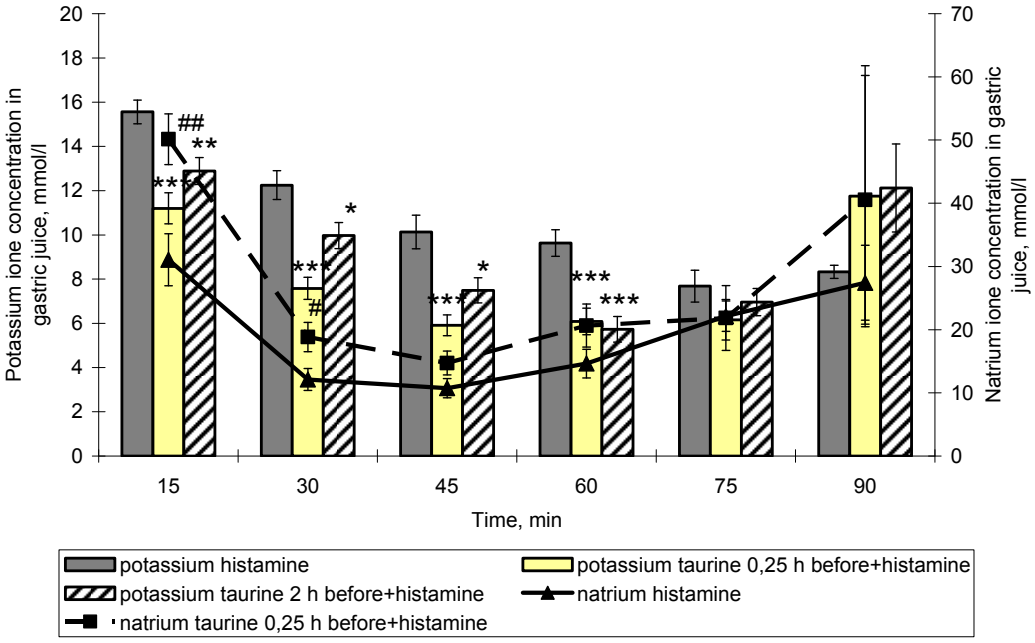


Fig.1. The influence of taurine (1,4 mg/kg) on Na^+ and K^+ concentration in gastric juice stimulated by histamine (0,05 mg/kg) in dogs (M±m; n=64)

References:

1. *Li F.* Taurine replacement attenuates hyperalgesia and abnormal calcium signaling in sensory neurons of STZ-D rats / Li F., Obrosova I.G., Abatan O. [et al.] // AJP: Endocrinol. Metab. - 2005. - V. 288. - P. E29-E36.
2. *Noulin J.F.* Two types of K channels at the basolateral membrane of proximal tubule: inhibitory effect of taurine / Noulin J.F., Brochiero E., Lapointe J.Y., Laprade R. // AJP: Renal. Physiol. - 1999. - V. 277, № 2. - P. F290-F297.
3. *Крешков А.П.* Основы аналитической химии 3 / Крешков А.П. - Москва: изд-во «Химия». - 1977. - С. 245-253.

КОМПЛЕКСНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ТАУРИНА, ЦИНКА И ПАНТЕНОЛА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В МОЗГЕ ПРИ ЭНДОТОКСИНЕМИИ

Гроховская Т.Ч., Лукиенко Е.П.

Научно-производственный центр "Институт фармакологии и биохимии Национальной академии наук Беларуси", Гродно, Беларусь
e-mail: tatyana-grokhovskaya@mail.ru

Универсальным звеном в патогенезе нарушений жизнедеятельности при экстремальных состояниях организма и различных заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы является токсинемия, выраженность которой предопределяется активностью детоксикационной и эндотоксинэлиминирующей функции [3]. Формируется системный воспалительный ответ, окислительный стресс, выраженное снижение содержания цинка в крови и повышение его экскреции с мочой [4], эксайтотоксичность в мозге вследствие гиперпродукции глутамата [5]. Известна отрицательная корреляция уровня глутамата и таурина в нервных окончаниях. Таурин нормализует дисбаланс аминокислот в мозге, оказывая влияние на "глутаматную компартментализацию": при насыщении нейронального компартмента таурином, последний "уходит" в глиальный слой, что сопровождается переходом туда и инактивацией возбуждающей аминокислоты глутамата с трансформацией последнего в глутамин [2]. Доказаны нейропротекторные свойства D-пантенола *in vivo* [1]. Все перечисленное диктует актуальность исследования возможности коррекции метаболических нарушений препаратами таурина, цинка и пантенола.

Поэтому целью настоящей работы явилась оценка протективного действия субстанций таурина, цинка и пантенола на редокс-статус белков и обмен глутамата в мозге при эндотоксинемии.

Исследованы показатели системы «глутамат-глутамин» (активность глутаминсинтетазы – ГС, глутаминаз и глутаматдегидрогеназы – ГлДг), уровень тиоловых и дисульфидных групп в белках в больших полушариях головного мозга крыс-самок линии *Wistar CRL:(WI) WU BR*, получавших внутрижелудочно пантенол (50 мг/кг), комплекс таурин+цинк (доза 100 мг/кг) отдельно либо в сочетании с пантенолом. Спустя 10 сут после начала введения субстанций животным внутрибрюшинно вводили бактериальный липополисахарид (БЛПС), кариотип *Es. coli K235*, с высоким уровнем токсичности, в дозе 0,4 мг/кг массы тела за 24 ч до забоя. В качестве групп сравнения отбирались животные здоровые и получавшие только БЛПС.

Введение животным БЛПС сопровождалось слабовыраженной гипертермией (повышение ректальной температуры на 0,7 ^{o}C).

При профилактическом назначении исследуемых субстанций отдельно либо в комплексе выявлено значительное увеличение редокс-статуса белков в больших полушариях, что связано как со снижением дисульфидных групп, так и с увеличением сульфгидрильных групп в белках, уровень общих сульфгидрильных групп не претерпевал значительных изменений.

Развитие бактериальной эндотоксинемии способствовало накоплению глутамата в нейроструктуре, что подтверждается снижением активности ГС и глутаминазы и ростом активности ГлДг в реакции с 2-оксоглутаратом. Предварительное назначение комплекса таурин+цинк предупреждало активацию ГлДг, падение активности глутаминазы и ГС. Известно, что повышение активности ГС важно для нормализации уровня внеклеточного глутамата и защиты клеток мозга от нейротоксических эффектов аминокислоты. [6]. Наиболее характерной особенностью действия пантенола явилась активация глутаминазы. Комплексное применение таурина, цинка и пантенола обнаружило суммацию эффектов исследуемых субстанций, а, именно, предупреждение активации ГлДг, активацию глутаминазы в 1,9 раза, активность ГС оставалась на уровне значений БЛПС.

Таким образом, комплексное применение таурина и цинка обнаруживает протективное действие на развитие токсических процессов в мозге. Курсовое назначение комбинации модулирует процессы, связанные с наработкой и накоплением глутамата в больших полушариях, и предупреждает эксайтотоксичность глутамата.

Работа выполнена в рамках гранта БРФФИ-РГНФ № Г10Р-021 «Нейрометаболические подходы к коррекции социально значимых церебральных патологий, вызванных стрессом»

Литература:

1. *Н.В. Гуляева, М.Ю. Степаничев, Н.А. Лазарева, А.Г. Мойсеёнок, М.В. Онуфриев, А.О. Тишкина, И.Н. Катковская* // Нейропротекторные свойства пантенола: исследование на модели окклюзии среднемозговой артерии у крысы - Нейрохимия, 2010, N 2, с.170-175.
2. *Л.И. Нефёдов* // Таурин (биохимия, фармакология и медицинское применение). - Мн.: , 1999.— 145с.
3. *Д.М. Попутников* // Изучение высвобождения внеклеточных пуринов в гипоталамусе при лихорадке – Функциональные системы организма в норме и при патологии : сб. науч. тр. / под ред. В. С. Улащика, А. Г. Чумака. – Минск: РИВШ, 2008, с. 162-169.
4. *Н.А. Шапошникова* // Роль дефицита цинка в развитии печеночной энцефалопатии - Экспер. и клин. гастроэнтерол., 2007, N 3, с. 108-112.
5. *St. P. Kevin, P. Jenner* // Extracellular accumulation of nitric oxide, hydrogen peroxide, and glutamate in astrocytic cultures following glutathione depletion, complex I inhibition, and/or lipopolysaccharide-induced activation. - Biochemical Pharmacology, 2000, Vol. 60, N 7, p. 979-988.
6. *C.K. Petito, M.C. Chung, L.M. Verkhovsky, A.J. Cooper* // Brain synthetase increases following cerebral ishemia in the rat. - Brain Res, 1992, Vol. 569, N 2, p. 275-280.

COMPLEX APPLICATION TAURINE, ZINC AND PANTHENOL FOR CORRECTION OF METABOLIC INFRINGEMENTS IN BRAIN AT ENDOTOXINEMIA

Hrakhouskaya T.Ch., Lukiyenka A.P.

Institute for Pharmacology and Biochemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus
e-mail: tatyana-grokhovskaya@mail.ru

Universal link in the pathogenesis of vital activity infringement under the extreme conditions of an organism and various diseases of infectious and noninfectious nature is toxinemia, the severity of which is predetermined by the activity of detoxificationary and endotoksineliminating functions [3]. Formed a systemic inflammatory response, oxidative stress, marked reduction of zinc content in the blood and increase its excretion in urine [4] and excitotoxicity in the brain due to glutamate overproduction [5]. It is known that negative correlation between the glutamate and taurine levels in nerve endings is there. Taurine normalizes the amino acids disbalance in brain, influencing on the "glutamate compartmentalization": under the saturation of neuronal compartment by the taurine, the last "go" to the glial layer that accompanied to the transition and inactivation of the glutamate excitatory with the transformation it in glutamine [2]. It is prove the neuroprotective properties of D-panthenol *in vivo* [1]. All of the above dictates the actuality studies of taurine, zinc, and panthenol for the metabolic therapy.

Therefore, the estimation of the protective action of taurine, zinc and panthenol substances to the redox status of proteins and the glutamate metabolism in brain under the endotoxemia was the aim of this work.

It was investigated "glutamate-glutamine" indexes (the activity of glutamine synthetase – GS, glutaminase and glutamate dehydrogenase – GIDG), the level of proteins thiol and disulfide groups in brain cerebral cortex of the line *Wistar CRL:(WI) WU BR* female rat, treated intragastric panthenol (50 mg/kg), complex taurine+zinc (100 mg/kg) alone or in combination with panthenol. Later than 10 days after the start of substances introduction, animals received an intraperitoneally injection of bacterial lipopolysaccharide (BLPS), karyotype *Es. coli K235*, with the high toxicity level, at dose of 0,4 mg/kg body weight, for 24 h before the decollation. As comparison groups were selected healthy and receive only BLPS animals.

The mild hyperthermia was accompanied after introduction BLPS (rectal temperature increased by 0,7 °C).

The prophylactic introduction of substances separately or in it combination showed a significant increase of the proteins redox-status in the cerebral cortex, which is associated both with reduced disulfide groups, as well as an increase in sulfhydryl groups in proteins, the level of total sulfhydryl groups did not undergo significant changes.

The development of bacterial endotoxemia promoted to glutamate accumulation in the neurostructure, what evidenced by a decreased activity of GS and glutaminase and activation GIDG in the reaction with 2-oxoglutarate. Pre-appointment of complex taurine+zinc prevented the activation of GIDG, reduction of glutaminase and GS activity. It is known that increased GS activity is important for the normalization of extracellular glutamate level and protect brain cells from the neurotoxic effects of this amino acid. [6]. The most characteristic feature of panthenol was glutaminase activated. Complex application of taurine, zinc and panthenol found the summation effects of the investigated substances as well as preventing GIDG activation, glutaminase activation in 1,9 times, the GS activity remained at values BLPS.

Thus, the complex application of taurine and zinc exhibits protective effect on the development of toxic processes in brain. Course assignment of this combination is modulated processes associated with the glutamate formation and accumulation in the cerebral cortex, and prevents glutamate excitotoxicity.

References:

1. *Н.В. Гуляева, М.Ю. Степаничев, Н.А. Лазарева, А.Г. Мойсеёнок, М.В. Онуфриев, А.О. Тишкина, И.Н. Катковская* // Нейропротекторные свойства пантенола: исследование на модели окклюзии среднемозговой артерии у крысы - Нейрохимия, 2010, N 2, с.170-175.
2. *Л.И. Нефёдов* // Таурин (биохимия, фармакология и медицинское применение). - Мн.: , 1999.— 145с.
3. *Д.М. Попутников* // Изучение высвобождения внеклеточных пуринов в гипоталамусе при лихорадке – Функциональные системы организма в норме и при патологии :сб. науч. тр. / под ред. В. С. Улащика, А. Г. Чумака. – Минск: РИВШ, 2008, с. 162-169.
4. *Н.А. Шапошникова* // Роль дефицита цинка в развитии печеночной энцефалопатии - Экспер. и клин. гастроэнтерол., 2007, N 3, с. 108-112.
5. *St. P. Kevin, P. Jenner* // Extracellular accumulation of nitric oxide, hydrogen peroxide, and glutamate in astrocytic cultures following glutathione depletion, complex I inhibition, and/or lipopolysaccharide-induced activation. - Biochemical Pharmacology, 2000, Vol. 60, N 7, p. 979-988.
6. *C.K. Petito, M.C. Chung, L.M. Verkhovsky, A.J. Cooper* // Brain synthetase increases following cerebral ishemia in the rat. - Brain Res, 1992, Vol. 569, N 2, p. 275-280.

ВЛИЯНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФРАКЦИИ (ДО 5 КДА) КОРДОВОЙ КРОВИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ДОНОРСКОЙ КРОВИ *IN VITRO* В ПРИСУТСТВИИ ИНГИБИТОРОВ ФАГОЦИТОЗА

Гулевский А.К., Горина О.Л., Моисеева Н.Н.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина
e-mail: olik2603@rambler.ru

В предыдущих исследованиях *in vitro* нами было установлено иммуномодулирующее действие низкомолекулярной (до 5 кДа) фракции кордовой крови крупного рогатого скота (ФКК) [1]. С целью выяснения механизма действия ФКК в настоящей работе исследовали фагоцитарную активность нейтрофилов в присутствии таких ингибиторов, как колхицин, угнетающего процессы полимеризации белков цитоскелета, и йодоацетат натрия, ингибирующего фермент гликолиза глицероальдегидфосфатдегидрогеназу.

При добавлении в среду инкубации колхицина происходило достоверное снижение всех фагоцитарных показателей нейтрофилов. Так, показатель фагоцитарного индекса нейтрофилов после инкубации клеток с колхицином снижался в 3,35 раз, а их поглотительная и переваривающая активность подавлялась в 5 раз и 3 раза, соответственно, по сравнению с контролем ($p<0,05$). Одновременная инкубация клеток с колхицином и низкомолекулярной фракцией не оказывала влияния как на количество активированных нейтрофилов, так и на их поглотительную и переваривающую способности. Таким образом, установлено, что низкомолекулярная фракция (до 5 кДа) кордовой крови КРС, по-видимому, не оказывают прямого влияния на структуры плазматической мембраны клеток в процессе фагоцитоза.

Инкубация нейтрофилов с йодоацетатом натрия способствовала уменьшению числа фагоцитирующих нейтрофилов на 32 %, поглотительной способности в 2,3 раза и переваривающей активности нейтрофилов в 2,16 раза по сравнению с контрольными значениями ($p<0,05$). Добавление в суспензию клеток с ингибитором гликолиза низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови КРС приводило к достоверному повышению данных показателей: количество фагоцитирующих клеток увеличивалось в 1,24 раза, поглотительная и переваривающая активность - в 2,33 и 2,14 раза, соответственно, в сравнении с вариантом инкубации с ингибитором.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что низкомолекулярная фракция (до 5 кДа) кордовой крови КРС оказывала стимулирующее действие на фагоцитарную активность нейтрофилов в условиях инкубации с гликолитическим ингибитором (йодоацетат натрия). Возможно, данный эффект обусловлен непосредственным участием низкомолекулярных компонентов ФКК в реакциях энергетического метаболизма нейтрофилов, что выражается в улучшении энергетического статуса клетки и, как следствие, ее функциональной активности.

Литература:

1.*Гулевский А.К.* Стимулирующее действие низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови и Actovegin на фагоцитарную активность деконсервированных лейкоцитов / Гулевский А.К., Горина О.Л., Моисеева Н.Н. [и др.] // Український журнал гематології та трансфузіології. – 2010. – № 1. – С. 22–29.

INFLUENCE OF THE CATTLE CORD BLOOD LOW-MOLECULAR (BELOW 5 kDa) FRACTION ON DONOR BLOOD NEUTROPHIL PHAGOCYTIC ACTIVITY *IN VITRO* IN THE PRESENCE OF PHAGOCYTOSIS INHIBITORS

Gulevsky O.K., Gorina O.L., Moiseyeva N.M.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NASU, Kharkiv, Ukraine
e-mail: olik2603@rambler.ru

In our previous investigations *in vitro* we discovered an immunomodulating effect of the cattle cord blood low-molecular (below 5 kDa) fraction (CBF) [1]. For the purpose of ascertainment mechanisms of action of CBF we studied phagocytic activity of neutrophils in the presence of such inhibitors as colhicin inhibiting cytoskeletal protein polymerization and sodium iodoacetate inhibiting a glycolysis enzyme – glyceroaldehydephosphate dehydrogenase.

Colhicin in incubation medium significantly depressed all the phagocytic parameters of neutrophils. Phagocytic index of neutrophils after incubation of cells with colhicin was 3.35 times as little as the control value, and their engulfing and digesting activities was 5 and 3 times less, respectively, as compared to the control ($p<0.05$). Simultaneous incubation of cells with colhicin and the low-molecular fraction had influence neither on the number of activated neutrophils nor on their engulfing and digesting capacities. Thus, it was demonstrated that CBF, apparently, had no direct influence on cell plasmatic membrane structures in the process of phagocytosis.

Incubation of neutrophils with sodium iodoacetate reduced the number of phagocyting neutrophils by 32%, engulfing capacity by 2.3 times and digesting activity of neutrophils - by 2.16 times as compared to the control values ($p<0.05$). Addition of CBF to cell suspension with glycolysis inhibitor led to a significant increase in these indices: the number of phagocyting cells was 1.24 times higher, the engulfing and digesting activities were 2.33 and 2.14 times higher, respectively, in comparison with cells incubated with the inhibitor.

Thus, the investigation performed revealed that CBF stimulated phagocytic activity of neutrophils under conditions of incubation with the glycolysis inhibitor (sodium iodoacetate). Perhaps this effect is due to a direct participation of low-molecular components of CBF in energy metabolism reactions in neutrophils, which shows as ascension of cell energy status and, as a consequence, its functional activity.

References:

1.*A.K. Gulevsky, O.L. Gorina, N.N. Moiseyeva, L.V. Stepanyuk* // Stimulating effect of a cord blood low-molecular fraction (below 5 kDa) and Actovegin on phagocytic activity of frozen-thawed leukocytes - Ukrainskyy Zhurnal Gematologii i Transfusiologii, 2010, no. 1, p. 22-29.

ВПЛИВ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНОЇ ФРАКЦІЇ (ДО 5 КДА) З КИШКОВИКА ХОЛОДОАДАПТОВАНИХ РИБ НА ПАРАМЕТРИ ЕКЗОГЕНОЇ ГІПОКСІЇ У МИШЕЙ

Гулевський О.К., Грищенкова О.О., Реліна Л.І., Погожих О.Г.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ, Харків, Україна
email: lianaisaakovna@rambler.ru

На протязі декількох десятиріч багато дослідників, які цікавляться механізмами заціпеніння тварин, ведуть пошук ендогенних речовин, що беруть участь у контролі стану зимового спокою у тварин різних таксонів. Такі речовини мають значну гіпометаболічну та гіпотермічну дію, причому вони не мають видової специфічності, оскільки впливають на представників еволюційно далеких видів. Подібні речовини могли б стати основою для новітніх лікарських засобів, які б дозволили розширити можливості медицини в напрямку керованих гіпометаболічно-гіпотермічних впливів. На сьогодні біоактивні фракції виділені з тканин видів, які не можут стати джерелом їх отримання в необхідному маштабі.

В той же час відомо, що карась сріблястий *Carassius auratus* переживає тривалі періоди при низькій температурі та надзвичайно низькому вмісту кисню у воді. Логічно припустити, що в тканинах *C.auratus* також містяться сполуки з гіпометаболічним та гіпотермічним ефектами. Тому метою представленої роботи було вивчення впливу низькомолекулярної фракції з тканин холодоадаптованих риб на здатність ссавців витримувати екзогену гіпоксію.

Досліди проводили на білих мишах. Фракцію до 5 кДа отримували з екстрактів кишковика “зимових” карасів методом ультрафільтрації в тангенціальному потоці. При дослідженні впливу фракції на стійкість мишей до гіпоксії використовували модель гіпоксії в замкнутому об'ємі, що дає змогу оцінювати дослідний адаптоген по показникам часу виживання (ЧВ), часу реститутції (ЧР) та інтегративному показнику резистентності (ЧВ/ЧР).

В наших дослідах фракцію з кишковика холодоадаптованих карасів вводили мишам внутрішньочеревно. Через 20 хв. після ін'єкції миші поміщалися в герметичну ємність для визначення ЧВ, ЧР та ЧВ/ЧР.

ЧВ в дослідній групі тварин складав 1587,4±80,0 сек., що достовірно відрізняється від контролю (1347,0±49,5 сек.).

Величина ЧВ характеризує індивідуальну стійкість особини до недостачі кисню, яка може залежати як від зовнішніх факторів, що змінюють стан тварин, так і від спадкових властивостей організму. У даному разі уведення фракції із кишковика холодоадаптованих карасів достовірно впливало на стійкість мишей до гострої екзогенної гіпоксії.

ЧР для тих же мишей в дослідній групі достеменно нижчий (8,0±1,9 сек.), ніж у контрольній (17,2±2,2 сек.). Індівідуальні показники ЧР коливаються у досліді від 3 до 15 сек., у контролі – від 13 до 25 сек. З даного показника видно, що особини, яким уведена фракція до 5 кДа, швидче повертаються до нормального стану.

Ще більш переконливим показником у даному дослідженні є співвідношення ЧВ/ЧР. У дослідній групі він більш ніж у 3 рази вищий, ніж у контрольній і дорівнює 81,0±6,0 і 25,4±6,2, відповідно.

Дія низькомолекулярної фракції залежить від кількості уведених речовин. Достовірні відміни між контрольною та дослідною групами мишей за показником ЧВ виявляються при введені їм по 9 мг фракції на особину. Подальше збільшення дози до 18 мг фракції ще більше підвищує ЧВ, але при введені 36 мг фракції спостерігається зменшення відмін у цьому показнику між контрольними та дослідними тваринами.

Отримані результати дають підставу вважати, що ін'єкції фракції до 5 кДа з кишковика "зимового" *C.auratus* підвищують стійкість мишей до екзогенної гіпоксії, очевидно підвищуючи їх здібності швидко мобілізовувати механізми індівідуальної адаптації до низького парціального тиску кисня.

INFLUENCE OF THE LOW-MOLECULAR FRACTION (BELOW 5 kDa) FROM INTESTINE OF COLD-ADAPTED FISH ON PARAMETERS OF EXOGENIC HYPOXIA IN MICE

Gulevsky O.K., Gryschenkova O.O., Relina L.I., Pogozhikh O.G.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NASU, Kharkiv, Ukraine
e-mail: lianaisaakovna@rambler.ru

A lot of researchers, who are interested in mechanisms of animals' dormancy, have been searching for endogenous substances controlling winter quiescence in animals from different taxons for several decades. Such substances have noticeable hypometabolic and hypothermic effects, moreover they are species nonspecific, since they affect representatives of evolutionary distant species. Substances like these could serve as a basis for novel pharmaceutical agents, which would allow widening resources of medicine in performing regulated hypometabolic-hypothermal impacts. To date bioactive fractions have been extracted from tissues of species that cannot become a source for their obtainment on a necessary scale.

At the same time it is known that the goldfish *Carassius auratus* survives long periods at low temperature and extremely low content of oxygen in water. It is logical to assume that there are compounds with hypometabolic and hypothermic effects in tissues of *C.auratus*, too. That is why the aim of the work presented is the investigation of the influence of a low-molecular fraction from tissues of cold-adapted fish on mammals' capacity for sustaining exogenic hypoxia.

The experiments were carried out in white mice. The fraction below 5 kDa was obtained from "winter" goldfish intestine extracts by ultrafiltration in tangential flow. The model of hypoxia in enclosed volume was used in the study of the influence of the fraction on tolerance of mice to hypoxia, which allows estimating an adaptogen tested by survival time (ST), restitution time (RT) and integrative index (ST/RT).

The intestine fraction was introduced in mice intraperitoneally in our experiments. 20 min after the injections mice were placed in a hermetic container for the determination of ST, RT and ST/RT.

ST in the experimental group was 1587.4±80.0 s, which differed significantly from the control (1347.0±49.5 s).

ST value characterizes the individual tolerance of a specimen to oxygen deficiency, which can depend both on environmental factors that change animals' condition and on hereditary features of the organism. In the case in question the administration of the fraction from intestine of cold-adapted goldfish significantly influenced the tolerance of mice to acute exogenic hypoxia.

RT of the same mice in the experimental group (8.0±1.9 s) was significantly lower than that the control one (17.2±2.2 s). The individual values of RT fluctuate from 3 to 15 s in the experimental group and from 13 to 25 s in the control one. This parameter shows that the animals which were injected with the fraction below 5 kDa revert to the normal condition faster.

The ratio ST/RT is a more convincing parameter in this investigation. In the experimental group it is higher by a factor of three as compared with the control mice and makes up 81.0±6.0 and 25.4±6.2, respectively.

The action of the low-molecular fraction depends on the amount of injected substances. Significant differences between the control and experimental groups of mice by ST became evident at the dose of 9 mg of the fraction per a specimen. A further increase in the dose up to 18 mg raised ST, but after the introduction of 36 mg of the fraction a reduction in the differences by this parameter between the control and experimental animals was observed.

The results obtained allow concluding that injections of the fraction below 5 kDa from "winter" *C.auratus* intestine enhance the tolerance of mice to exogenic hypoxia, apparently raising their capacity for fast mobilization of individual adaptive mechanisms to oxygen low partial pressure.

РЕПАРАТИВНА ДІЯ ДЕПРОТЕЇНІЗОВАНИХ ГЕМОДІАЛІЗАТІВ З КРОВІ МОЛОЧНИХ ТЕЛЯТ

Гулевський О.К., Моісєєва Н.М., Абакумова О.С., Щенявський І.Й., Нікольченко А.Ю.

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків
e-mail: danalado@rambler.ru

Відомо, що до складу депротеїнізованого гемодіалізату (фракція 0-5 кДа) із крові молочних телят входить великий спектр біологічно активних компонентів. У попередніх дослідженнях була встановлена ранозагоююча дія цієї фракції [1, 2, 3]. Однак, які компоненти виконують домінуючу дію в процесах регенерації, не з'ясовано. З цією метою фракцію методом ультрафільтрації було розділено на фракції 0-1 кДа і 1-5 кДа та досліджено їх ранозагоюючу дію у порівнянні з дією фракції 0-5 кДа на моделях аспіринової виразки шлунку та опікової рани IIIB ступеня у щурів.

На моделі аспіринової виразки шлунку було встановлено більш скоріше зменшення площі виразкового ушкодження після введення експериментальним тваринам фракції 1-5 кДа у порівнянні з введенням фракції 0-5 кДа. Введення фракції 0-1 кДа не сприяло зменшенню виразкової площі слизової оболонки. З цими даними узгоджується тенденція, яка спостерігалася при визначенні в периферичній крові щурів з виразковим ураженням шлунку вмісту ТБК-реагуючих продуктів (ТБКРП) та активності лужної фосфатази (ЛФ). Нормалізація вмісту даних біохімічних показників після введення фракції 1-5 кДа свідчить про зниження запальної реакції в ураженій ділянці, що сприяє прискоренню процесів її відновлення.

На моделі термічного опіку IIIB ступеня встановлено, що після введення експериментальним щурам фракцій 0-5 кДа, 1-5 кДа та 0-1 кДа площа опікової рани однаково вірогідно ($p<0,05$) зменшувалась відносно значення у контролі. Однак зниження підвищених внаслідок опіку активності ЛФ і вмісту ТБКРП було встановлено в більш раніші строки експерименту після введення фракції 1-5 кДа у порівнянні з іншими експериментальними групами.

Таким чином, проведені дослідження репаративної дії депротеїнізованих гемодіалізатів встановили, що основна частина низькомолекулярних біологічно активних чинників крові молочних телят, вочевидь, міститься у діапазоні молекулярних мас від 1 до 5 кДа.

Литература:

1. Эффект стимуляции репаративных процессов под влиянием фракции до 5 кДа из пуповинно-плацентарной крови крупного рогатого скота / А.К. Гулевский, В.И. Грищенко, Н.Н. Моисеева, Е.С. Абакумова, А.Ю. Никольченко, И.И. Щенявский, О.Л. Долгих // Доповіді Національної Академії Наук України. - №2. – 2008. – С. 157 – 160.
3. Влияние фракции кордовой крови (до 5 кДа) крупного рогатого скота на биохимические показатели крови при экспериментальной субхронической язве желудка у крыс / А.К. Гулевский, Е.С. Абакумова, Н.Н. Моисеева, О.Л. Долгих // Український біохімічний журнал. – 2008. - Т. 80, № 2. - С. 120 – 126.
4. Влияние низкомолекулярной фракции до 5 к Да кордовой крови на фагоцитарную активность нейтрофилов в периферической крови крыс после ожога IIIв степени / Моисеева Н.Н. // Вісник проблем біології і медицини. – 2009. – Вип. 3. – С.140-145.

REPARATIVE ACTION OF DEPROTEINIZED HEMODIALYSATES FROM VEALER BLOOD

Gulevsky O.K., Moiseyeva N.M., Abakumova O.S., Schenyavsky I.Yo., Nikolchenko A.Yu.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NASU, Kharkiv, Ukraine
e-mail: danalado@rambler.ru

It is known that a deproteinized hemodialysate (fraction 0-5 kDa) from vealer blood contains a great variety of biologically active components. In our previous investigations the wound-healing activity of this fraction was proved [1-3]. However, it is still unclear which components play a dominating role in reparative processes. For this purpose the fraction was separated into fractions 0-1 kDa and 1-5 kDa by ultrafiltration and their wound-healing activities were studied in comparison with the action of the fraction 0-5 kDa on the models of aspirin-induced stomach ulcer and IIIb degree burn in rats.

On the model aspirin-induced stomach ulcer it was revealed that the area of ulcer lesions reduced faster after the fraction 1-5 kDa injections in comparison with the introduction of the fraction 0-5 kDa. The administration of the fraction 0-1 kDa caused no reduction in ulcer area of stomach mucous coat. These data agree with the profiles of thiobarbituric acid-active products (TBAPs) content and alkaline phosphatase (AP) activity in peripheral blood of rats with stomach ulcers. Normalization of these biochemical parameters after the fraction 1-5 kDa injections attests to a decline in inflammatory response in the affected region, which promotes its faster renewal.

On the model thermal IIIb degree burn it was established that after the introduction of the fractions 0-5 kDa, 1-5 kDa and 0-1 kDa the area of burns equally decreased ($p<0.05$) related to the control value. Nevertheless, the fraction 1-5 kDa lowered the elevated because of burn AP activity and TBAPs content by earlier terms of the experiment in comparison with the other fractions.

Thus, the investigation of reparative action of the deproteinized hemodialysates discovered that the major portion of low-molecular bioactive factors from vealer blood was mostlikely to belong to the range of molecular weights from 1 to 5 kDa.

References:

1. *A.K. Gulevsky, V.I. Grischenko, N.N. Moiseyeva, Ye.S. Abakumova, A.Yu. Nikolchenko, I.I. Schenyavsky, O.L. Dolgikh* // Effect of stimulation of reparative processes by the fraction below 5 kDa from the cattle umbilical-placental blood - Dopovidi Natsionalnoi Akademii Nauk Ukrainy, 2008, no. 2, p. 157-160.
2. *A.K. Gulevsky, Ye.S. Abakumova, N.N. Moiseyeva, O.L. Dolgikh* // Influence of the cattle cord blood fraction (below 5 kDa) on blood biochemical indices under experimental subchronic stomach ulcer in rats - Ukrainsyy Biokhimichnyy Zhurnal, 2008, vol. 80, no. 2, p. 120-126.
3. *N.N. Moiseyeva* // Influence of the cord blood low-molecular (below 5 kDa) fraction on phagocytic activity on neutrophils in peripheral blood in rats after IIIb degree burn – Visnyk Problem Biologii i Medytsyny, 2009, no. 3, p. 140-145.

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА «СКВААКАН»

Датиева Ф.С., Хетагурова Л.Г., Нартикоева М.И., Батагова Ф.Э., Гриднев Е.А.

УРАН Институт биомедицинских исследований Владикавказского научного центра РАН и Правительства РСО-Алания, Владикавказ, Россия. e-mail: institutbmi@mail.ru

Поиск лечебных препаратов, восстанавливающих защитные и адаптивные механизмы у больных с различными, в том числе, и опухолевыми заболеваниями, повышающих качество жизни и общую жизнестойкость организма является актуальной задачей современной медицины. В этом плане, важное значение приобретают препараты на основе животного сырья, изготовленные таким образом, чтобы сохранить ценные качества их тканей и клеток.

Препарат «Скваакан» (патент №2211700 от 10.09.2003) получен из экстракта натуральных клеток печени акулы катрана – (Extractum hepatic Squalis acantias stabilisatae) творческой группой отдела Биоактивных соединений ИБМИ ВНЦ РАН и РСО-А в виде раствора по 2 мл для в/м инъекций [3, 4]. Ранее в эксперименте препарат проявлял: выраженные антиоксидантные свойства [1]; существенную профилактическую активность при экспериментальном канцерогенезе молочной железы, проявляющуюся достоверным снижением частоты возникновения злокачественных опухолей, замедлением темпов их роста, что, возможно, обусловлено повышением противоопухолевой резистентности на групповом и индивидуальном уровнях [5].

Изучение биологических эффектов препарата «Скваакан» мы проводили в эксперименте, использовали половозрелых крыс обоего пола (5 месяцев) линии Wistar, прошедших карантин в течение 14 дней (питомник Пятигорской государственной фармацевтической академии). Контрольная группа содержалась в тех же условиях, что и подопытные крысы, они получали вспомогательные ингредиенты (физиологический раствор) тем же способом (в/м). Животных содержали в виварии в обычных условиях при естественном освещении, в пластиковых клетках по 6 особей, давали воду и пищу ad libitum. Животные получали стандартную диету, в соответствии с которой наряду с зерновыми в рацион дополнительно входили творог, каша из отрубей и мясокостная мука. Препарат вводили в промежутке от 13 до 14 часов ежедневно на протяжении двух месяцев эксперимента, внутримышечно. Изучали клеточный и плазменный факторы системы гемостаза (активность тромбоцитов, АЧТВ, ТВ, показатели времени свертывания цельной крови), липидный спектр, тромборезистентность сосудистой стенки, микроциркуляцию.

При исследовании механизмов действия препарата «Скваакан» на компоненты системы гемостаза у лабораторных экспериментальных животных и оценке его безопасности выявлены наиболее чувствительные к препарату функционально-структурные блоки свертывающей системы - впервые установлено, что в первые 15 дней введения препарата отмечается активизация клеточного звена гемостаза (повышалась агрегационная активность тромбоцитов), а на фоне хронического приема препарата «Скваакан» (50 кратная терапевтическая доза – 0,35-0,38 мл в/м, 2 мес.) происходит торможение клеточного и плазменного звеньев системы гемостаза у здоровых животных, улучшение реологических свойств крови.

Впервые выявлена проагрегационная активность экспериментального препарата «Скваакан» in vitro в человеческой плазме больных старше 40 лет с сердечно-сосудистой патологией. Учитывая результаты, полученные в экспериментах in vivo (на лабораторных животных) показано его тормозящее действие на систему гемостаза лабораторных животных. Возможно эффекты in vivo обеспечиваются метаболическими изменениями препарата в организме. С другой стороны, входящие в состав экстракта печени акулы катран субстраты могут выступать в качестве фосфолипидных матриц, на которых процессы активации тромбоцитов и свертывания крови происходят быстрее [2].

Изучение влияния «Скваакана» на липидный спектр крови показало снижение количества триглицеридов и липопротеидов высокой плотности через 15 суток в/м введения препарата.

Таким образом, полученные результаты в опытах in vivo и in vitro расширяют наши представления о механизмах биологических эффектов препарата «Скваакан» и требуют его дальнейшего доклинического изучения.

Литература:

1. *Батагова Ф.Э., Скупневский С.В., Хубецова Р.Д.* Изучение антиоксидантных свойств биологически активного препарата животного происхождения «Скваакана»// Владикавказский медико-биолог. вест., 2008-2009.Том.8. Вып.14. С.65-68.
2. *Датиева Ф.С., Хетагурова Л.Г., Батагова Ф.Э., Нартикоева М.И.* Исследование специфических фармакологических эффектов экспериментального препарата «Скваакан» в опытах in vitro// Владикавказский медико-биолог. вест., 2010.Том.10. Вып.17. С.46-49.
3. *Хубецова Р.Д., Гриднев Е.А.* Использование биологически активного препарата из животного сырья в терапии тканевой гиперплазии//Владикавказский медико-биолог. вест., 2003.Том.3. Вып.6. С.83-87.
4. *Хубецова Р.Д., Гриднев Е.А., Сланов Р.И.* Новый адъювантный препарат «Скваакан»// Владикавказский медико-биолог. вест., 2005.Том.5. Вып.9. С.47-50.
5. *Хубецова Р.Д., Батагова Ф.Э., Гриднев Е.А.* Влияние биоорганического препарата «Скваакан» на опухолевый рост в эксперименте//Владикавказский медико-биолог. вест., 2006-2007.Том.6. Вып.12. С.61-64.

THE STUDY OF THE BIOLOGIC EFFECTS OF THE EXPERIMENTAL PREPARATION «SQUAAKAN"

Datiyeva F.S., Khetagurova L.G., Nartikoyeva M.I., Batagova F.E., Gridnev Ye.A.

ERAS Institute of Biomedical Research of RAS VSC and Government of RNO-Alania, Vladikavkas, Russia
e-mail: institutbmi@mail.ru

The search of the medical preparations, restoring the protective and adaptative mechanisms in patients with different diseases, including tumor diseases, increasing living standards and organism common living stability is the actual problem of modern medicine. In this plan, the main importance acquire the preparations on the basis of the animal raw material, manufactured so as to preserve valuable quality of their tissues and cells.

The preparation "Squaakan" (patent №2211700 of 10.09.2003) is received from the extraxt of the natural cells of the katran shark liver - (Extractum hepatic Squalis acantias stabilisatae) by thecreative group of the Department of the Bioactive compounds of IBMR VSC RAS and RNO-A in the form of solution by 2 ml for the intramuscular injections [3, 4]. Earlier in the experiment the preparation showed: the expressed antioxidant properties [1]; the essential prophylactic activity while the experimental carcinogenesis of mammary gland, manifestating with the reliable decrease of the frequency of the malignant tumours occurrence, with the lowering of the speed of their growth, that probably is led to the increase of antitumoral resistance at the group and individual levels [5].

The study of the biologic effects of the preparation "Squaakan" we performed while the experiment, we used the pubertal rats of both sex (5 months) of Wistar line, gone the quarantine during 14 days (the nursery of the Pyatigorsk State Pharmaceutical academy). The control group was held under the same conditions, as the experimental rats, they received supplementary ingredients (physiologic solution) according to the same way (intramuscular). The animals were held in the vivarium under the common conditions upon the natural lighting, in the plastic cages by 6 individuals, gave water and food ad libitum. The animals received the standard diet, according to which in addition with the cereals, curd cheese, porridge from bran and bone meal flour entered the ration. The preparation was injected in the gap from 13 to 14 hours daily for 2 months of the experiment intramuscular. We studied the cellular and plasmatic factors of the hemostasis system (thrombocytes activity, APTT, TT, the indices of whole blood coagulation time), lipid spectrum thromboresistance of vascular wall, microcirculation.

While the investigation of the mechanisms' action of the preparation "Squaakan" on the components of hemostasis system in the laboratory experimental animals and the evaluation of its safety – more sensitive to the preparation functional-structural units of the coagulative system were revealed – for the first time it was established, that during the first 15 days of the preparation injection, it is noted the activization of the cellular link of hemostasis (the aggregational thrombocytes activity increased), but on the background of the chronic take of the preparation "Squaakan" (50-fold therapeutic dose – 0.35-0.38 ml intramuscular, during 2 months) the inhibition of cellular and plasmatic system in healthy animals, the improvement of rheologic blood properties are occurred.

For the first time it was revealed the proaggregational activity of the experimental preparation "Squaakan" in vitro in the human plasma of patients over 40 years with cardio-vascular pathology. Considering the results, obtained in the experiments in vivo (on the laboratory animals) it was showed its inhibition action of the hemostasis system of the laboratory animals. Probably the effects in vitro are supplied with metabolic changes of the preparation in the organism. On the other hand, entering the component of the extract of shark katran liver the substrates may be as phospholipide matrixes, where the processes of thrombocytes activation and blood coagulation occur quicker [2].

The study of the "Squaakan" influence on the lipids blood spectrum showed the decrease of the number of triglycerides and lipoproteins of high density in 15 days of intramuscular injection of this preparation.

Thus, the obtained results during the experiments in vivo and in vitro widen our ideas about the mechanisms of biologic effects of the preparation "Squaakan" and require its further preclinical study.

References:

1. *Батагова Ф.Э., Скупневский С.В., Хубецова Р.Д.* Изучение антиоксидантных свойств биологически активного препарата животного происхождения «Скваакана»// Владикавказский медико-биолог. вест., 2008-2009.Том.8. Вып.14. С.65-68.
2. *Датиева Ф.С., Хетагурова Л.Г., Батагова Ф.Э., Нартикоева М.И.* Исследование специфических фармакологических эффектов экспериментального препарата «Скваакан» в опытах in vitro// Владикавказский медико-биолог. вест., 2010.Том.10. Вып.17. С.46-49.
3. *Хубецова Р.Д., Гриднев Е.А.* Использование биологически активного препарата из животного сырья в терапии тканевой гиперплазии//Владикавказский медико-биолог. вест., 2003.Том.3. Вып.6. С.83-87.
4. *Хубецова Р.Д., Гриднев Е.А., Сланов Р.И.* Новый адъювантный препарат «Скваакан»// Владикавказский медико-биолог. вест., 2005.Том.5. Вып.9. С.47-50.
5. *Хубецова Р.Д., Батагова Ф.Э., Гриднев Е.А.* Влияние биоорганического препарата «Скваакан» на опухолевый рост в эксперименте//Владикавказский медико-биолог. вест., 2006-2007.Том.6. Вып.12. С.61-64.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ КОМПЛЕКСНЫХ ФИТОАДАПТОГЕНОВ

Датиева Ф.С., Хетагурова Л.Г., Тагаева И.Р.

УРАН Институт биомедицинских исследований Владикавказского научного центра РАН и Правительства РСО-Алания, Владикавказ, Россия. e-mail: institutbmi@mail.ru

Фитопрепараты, стимулирующие сопротивляемость организма, способные мобилизовать незадействованные в обычной жизни резервные механизмы, повышающие адаптацию, заслуживают особого внимания современной медицины. Комплексные фитоадаптогены (КФА), в состав которых входят различные фитопрепараты способны к модулированию биологических эффектов в зависимости от исходного состояния системы, вовлеченной в патологический процесс [1-3].

В исследовании использовали формулы КФА - фитококтейли «Биоритм-ДС», «Биоритм-РС» и «Биоритм-Э». Фитококтейль (ФК) «Биоритм-РС» составляли из смеси спиртовых экстрактов в определенных пропорциях: родиолы розовой, солодки голой, элеутерококка колючего, девясила высокого; ФК «Биоритм-ДС» - девясила высокого, солодки голой, элеутерококка колючего и родиолы розовой; ФК «Биоритм-Э» - элеутерококка колючего, родиолы розовой, солодки голой, девясила высокого. Все ФК были созданы и апробированы на крысах, кроликах, собаках и волонтерах с десинхронозами в лаборатории традиционной медицины отдела «Хронопатофизиологии и рекреации здоровья» Института биомедицинских исследований ВНЦ РАН и РСО-А.

У крыс-самцов линии Вистар (массой 180-200 г), находившихся на стандартном пищевом рационе и получавших фитоктейли в поилке в разведении 1:50 (растворитель – питьевая вода), после 15 суток приема изучали: компоненты системы гемостаза (агрегацию тромбоцитов – индуктор АДФ в концентрации 5 и 10 мкг/мл), тромборезистентность сосудов, макро- и микроциркуляцию, липидный спектр. Статистическую обработку производили методом вариационной статистики с использованием компьютерной программы статистического анализа Microsoft Excel и Statistica 6.0.

При изучении влияния комплекса фитоадаптогенов, включенных в формулу фитококтейлей на клеточное звено системы гемостаза (тромбоциты) и микроциркуляцию в эксперименте была доказана выраженная активизация тканевого обмена, особенно при использовании ФК «Биоритм-ДС», содержащего доминанту – родиолу розовую, являющуюся мощным антиоксидантом. Биологические эффекты фитоадаптогенов менялись в зависимости от сроков их применения - в начале эксперимента снижалась систолическая скорость в микрососудах; этот эффект исчезал на фоне продолжительного приема ФК «Биоритм-РС». Эффекты КФА, полученные нами в эксперименте демонстрируют проявление на фоне их приема признаков гипоксии, особенно в первые сутки применения, что, согласно данным литературы [4], объясняет их способность включать адаптационные механизмы организмы для борьбы с гипоксией.

Корреляционный анализ показал, что на фоне приема ФК ДС взаимодействия между гемодинамической и клеточной системами свертывания (тромбоциты) становятся более упорядоченными, а системные взаимосвязи более гармоничными и, соответственно, более устойчивыми, тогда как при использовании ФК РС количество достоверных корреляций значительно уменьшается, что расширяет диапазон колебаний в системе и, возможно, свидетельствует о более интенсивном поиске механизмов хроноадаптации. Прием ФК «Биоритм-Э» повышал чувствительность тромбоцитов к АДФ в эксперименте, что выражается в отсутствии дозозависимого эффекта индуктора, который присутствует у интактных животных. Изучение влияния ФК на липидный спектр крови показало снижение количества триглицеридов и липопротеидов высокой плотности через 15 суток после начала эксперимента.

Эффекты комплексных фитоадаптогенов, содержащих преимущественно девясил высокий, развиваются в более ранние сроки, чем при включении в их состав родиолы розовой, к 15 суткам основные эффекты ФК выравниваются, т.е. биологический эффект родиолы проявляется при более длительном приеме ФК РС. ФК «Биоритм-ДС» более выражено влияет на центральную гемодинамику, тогда как эффекты ФК «Биоритм-РС» проявляются преимущественно на уровне микроциркуляторного звена. Все ФК повышают чувствительность и активность агрегационной функции тромбоцитов, а ФК «Биоритм-РС» и «Биоритм-Э» достоверно повышают тромборезистентные свойства сосудистой стенки, что позволяет рекомендовать их к дальнейшим клиническим исследованиям у спортсменов, для повышения емкости адаптации к физическим нагрузкам, и пациентам с сердечно-сосудистой патологией.

Литература:

1. *Датиева Ф.С., Хетагурова Л.Г.* Новые технологии фитокоррекции нарушений микроциркуляции при ожоговой травме в эксперименте // Владикавказский медико-биологический вестник. 2003. Т.3. Вып.6. С.67-70.
2. Стресс (Хрономедицинские аспекты)/*Л.Г.Хетагурова, Н.К.Ботоева, Л.Т.Урумова и [др.]* Владикавказ: Проект-Пресс, 2010. 192 с.
3. *Хетагурова Л.Г., Тагаева И.Р., Урумова Л.Т. [и др.]* Хронотерапия стресса (метод. пособие). Владикавказ, 2005. 62 с.
4. Шилов В Н. Молекулярные механизмы структурного гомеостаза. М., Интерсигнал, 2006.288 с.

THE INVESTIGATION OF THE BIOLOGIC EFFECTS OF THE COMPLEX PHYTOADAPTOGENS

Datiyeva F.S., Khetagurova L.G., Tagayeva I.R.

ERAS Institute of Biomedical Research of RAS VSC and Government of RNO-Alania, Vladikavkas, Russia
e-mail: institutbmi@mail.ru

Phytopreparation, stimulating the organism resistance, can mobilize unmobilized in the usual life reserve mechanisms, increasing adaptation, require particular attention of modern medicine. Complex phytoadaptogens (CPhA), in the compound of which enter different phytopreparations, are able to the modulation of biologic effects depending on the initial state of the system, involved in the pathologic process [1-3].

The formulas CPhA – phytococktails “Biorhythm-IG”, and “Biorhythm-E” were used in the investigation. Phytococktail (PhC) “Biorhythm-RG” formed from the mixture of the alcohol extracts in the definite proportions: Rodiola rosea, Glycyrrhiza glabra, Eleutherococcus senticosus, Inula helenium; PhC “Biorhythm-IG” - Inula helenium, Glycyrrhiza glabra, Eleutherococcus senticosus, Rodiola rosea; PhC “Biorhythm-E” - Eleutherococcus senticosus, Rodiola rosea, Glycyrrhiza glabra, Inula helenium. All PhC were created and approved on the rats, rabbits, dogs and volounteers with desynchronoses in the laboratory of the traditional medicine of the department “Chronopathophysiology and Health Recreation”of Biomedical Investigation Institute of VSC RAS and RNO-Alania.

In male-rats of Wistar line (mass 10-200 g) having been on the standard food ration and having received phytococktail in the feeding cup in the dilution 1:50 (the solvent – drinking water), after 15 days of taking studied: the components of hemostasis system (the aggregation of thrombocytes – ADP inductor in the concentration 5 and 10 mkg/ml). The statistic processing was performed according to the method of variation statistic analysis Microsoft Excel and Statistica 6.0.

While the study of the influence of phytoadaptogens complex, included in the formula of phytococktails, on the cellular link of hemostasis system (thrombocytes) and microcirculation in the experiment the expressed activation of the tissue metabolism was proved, particularly while the use of PhC “Biorhythm-IG”, containing dominant - Rodiola rosea, being mighty antioxidant. The biologic effects of phytoadaptogens changed depending on the time of their use – at the beginning of the experiment the systolic rate decreased in the microvessels; the effect disappeared on the background of the long take of PhC “Biorhythm-RG”. The effects of CPhA, obtained in the experiment, show the manifestation of hypoxia signs on the background of their take, particularly during the first days of the use, which according to the literature data [4], explain their ability to include adaptational organism mechanism in the fight with hypoxia.

Correlation analysis showed, that on the background of PhC-IG take the interaction between hemodynamic and cellular coagulation systems (thrombocytes) become more regulated, but the systemic interaction – more harmonious and, accordingly, more stable, while during the use of PhC-RG the amount of the reliable correlations considerably decrease, and it widens the range of fluctuation, and, probably, shows more intensive search of chronoadaptative mechanisms. The take of PhC “Biorhythm-E” increased the thrombocytes sensitivity to ADP in the experiment, and it is expressed in the absence of dose-depending effect of inductor, which is present in the intact animals. The study of PhC influence on the lipid blood spectrum showed the decrease of the amount of triglycerides and lipoproteids of high density in 15 days after the beginning of the experiment.

The effects of complex phytoadaptogens, containing mainly Inula helenium, develop during earlier period, then while the inclusion in their compound Rodiola rosea, by the 15-th days the main PhC effects become even, that is the biologic effect of the Rodiola manifestates while longer PhC-RG take. PhC “Biorhythm-IG” influences the central hemodynamics more expressed, while the PhC “Biorhythm-RG” effects appears mainly at the level of microcirculatory link. All PhCs increase sensitivity and activity of the thrombocytes aggregational function, but PhC “Biorhythm-RG” and “Biorhythm-E” reliably increase thromboresistant properties of the vascular wall, and it allows to recommend them to the further clinical examinations in sportsmen, for the increase of the capacity of adaptation to the physical exertion, and to the patients with cardio-vascular pathology.

References:

1. *Датиева Ф.С., Хетагурова Л.Г.* Новые технологии фитокоррекции нарушений микроциркуляции при ожоговой травме в эксперименте // Владикавказский медико-биологический вестник. 2003. Т.3. Вып.6. С.67-70.
2. Стресс (Хрономедицинские аспекты)/*Л.Г.Хетагурова, Н.К.Ботоева, Л.Т.Урумова и [др.]* Владикавказ: Проект-Пресс, 2010. 192 с.
3. *Хетагурова Л.Г., Тагаева И.Р., Урумова Л.Т. [и др.]* Хронотерапия стресса (метод. пособие). Владикавказ, 2005. 62 с.
4. *Шилов В Н.* Молекулярные механизмы структурного гомеостаза. М., Интерсигнал, 2006.288 с.

НОВОЕ СОЕДИНЕНИЕ «АК» СНИЖАЕТ АЛКОГОЛЬНУЮ МОТИВАЦИЮ У КРЫС

[1]Демченко Е.М., [1]Родинский А.Г., [2]Ярош А.К., [1]Богданова О.А., [1]Белоконь В.Н.

[1]Днепропетровская государственная медицинская академия, Днепропетровск, Украина
e-mail: Bogdanova_OA@ukr.net
[2]Украинский институт фармакологи и токсикологии, Киев, Украина

Специфическим и стойким симптомокомплексом хронического алкоголизма, определяющим его динамику и стадийность, является патологическое влечение к алкоголю. Этот симптомокомплекс почти не поддается фармакотерапии, поэтому решение проблемы лечения алкоголизма связано в значительной степени с разработкой средств подавления алкогольной мотивации. В связи с этим, поиск новых препаратов, снижающих потребление этанола, что и явилось целью наших исследований, является важным направлением в биологии и медицины.

Мотивацию к алкоголю у крыс формировали путем свободного выбора в качестве питья 15% раствора этанола или воды, которыми наполнялись две поилки. Через 1 месяц хронического эксперимента животные, предпочитавшие алкоголь, были разделены на 2 группы – контрольные («алкоголь»), которым в течение 2 недель внутрибрюшинно вводился изотонический раствор, и крысы, получавшие инъекции испытуемого вещества «АК» («алкоголь+препарат»). После курсового введения препарата у экспериментальных крыс отмечалось снижение потребляемого этанола с 12,16+ 1,11 мл/сутки до 8,88+1,10 мл/ сутки, т. е. на 27% ($p<0,05$). У контрольных животных существенных изменений не выявлено.

Формирование стойкого влечения к алкоголю определяется фармакологическими свойствами этилового спирта, одним из которых является анксиолитический еффект, наличие которого можно определить при исследовании интегративной деятельности ЦНС.

Изучение спонтанной поведенческой активности показало, что у крыс группы «алкоголь» существенно повышалась эмоциональная активность, на что указывало увеличение болюсов дефекаций и уринаций более чем в 3 раза. Кроме этого животные проявляли повышенную тревожность, так как практически не выходили в центр площадки. Введение препарата «АК» алкоголизированным животным сопровождалось восстановлением эмоционального компонента поведения и уменьшением тревоги.

Возможно, эффект снижения влечения к алкоголю нового соединения «АК» обусловлен наличием его анксиолитического действия.

A NEW COMPOUND "AK" REDUCES ALCOHOL MOTIVATION IN RATS

[1]*Demchenko E.M.*, [1]*Rodinskiy A.G.*, [2]*Yarosh A.K.*, [1]*Bogdanova O.A.*, [1]*Belokon V.N.*

[1] Dnepropetrovskaya State Medical Academy, Dnepropetrovsk, Ukraine
e-mail: Bogdanova_OA@ukr.net
[2] Ukrainian Institute of Pharmacology and Toxicology, Kiev, Ukraine.

The pathological attraction to alcohol - is a specific and persistent symptom complex of chronic alcoholism, determining its dynamics and staging. This symptom complex almost defies pharmacotherapy therefore the decision of problem of alcoholism treatment is substantially explained by the drugs development of alcoholic motivation suppression. In connection with this, the search of new drugs that reduce consumption of ethanol was the purpose of our research that is an important trend in biology and medicine.

The motivation to alcohol in rats formed through free choice to drink of 15% ethanol solution or water, with which filled two drinkers. After 1 month of chronic experiment the animals elected alcohol, were divided into 2 groups - control ("alcohol"), which within 2 weeks intraperitoneally introduced of isotonic solution, and the rats that received injections of the testing substance "AK" ("alcohol+drug"). After course of treatment in experimental rats there was a reduction in consumption of ethanol with 12,16+ 1,11 ml/day to 8.88+1.10 ml/ day, i.e., by 27% ($p<0.05$). In the control animals no significant changes were detected.

The formation of persistent attraction to alcohol is determined by pharmacological properties of ethanol, one of which is the anxiolytic effect, which can be determined by the study of integrative activity of the CNS.

The study of spontaneous behavioral activity showed that in rats of "alcohol" group was significantly increased emotional activity, as indicated by increase in defecations and urination more than in 3 times. In addition, the animals showed increased anxiety, because almost did not go in the center of the site. The introduction of the drug "AK" to the alcoholized animals was accompanied by the restoration of emotional component of behaviour and reduction of anxiety.

Perhaps, the effect of reducing attraction to alcohol by new compound "AK" is caused by its anxiolytic action.

ИЗУЧЕНИЕ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА "МЕТОВИТАН"

Донченко Г.В., Пархоменко Ю.М., Беккерман А.М.

Институт биохимии им. А.В. Палладина НАНУ, Киев, Украина
e-mail: yupark@biochem.kiev.ua; dongv@biochem.kiev.ua

Комплексный витаминный препарат "Метовитан" создан на основе результатов фундаментальных исследований функциональной взаимосвязи обмена витаминов между собой и с обменом других биологически активных соединений, которые проводятся в Институте биохимии НАН Украины. Соотношение ингредиентов в этом препарате строго подобрано с целью создать в тканях организма условия для активации обмена экзогенного метионина (компонента препарата) по пути транссульфирования и трансметилирования. Активация этих процессов способствует повышению синтеза глутатиона – природного пептида, который является важным компонентом биохимической системы антиоксидантной защиты организма и принимает участие в реакциях детоксикации чужеродных соединений.

Высокое детоксицирующее действие препарата по отношению к ксенобиотикам показано на нескольких экспериментальных моделях, в частности, на модели острого отравления крыс тетрахлорэтаном, на модели лекарственного гепатита (введение крысам парацетамола в дозе ½ ЛД50), на различных экспериментальных моделях алкоголизма. В качестве препарата сравнения использовали метионин. Наиболее детально изучено действие препарата "Метовитан" на модели хронического алкоголизма (содержание крыс в течение 4-5 месяцев на 15% растворе этанола). Препарат "Метовитан" вводили крысам орально с помощью зонда в течение 5 дней до окончания опыта. Эффективность препарата определяли по его способности нормализовать биохимические параметры, которые критически изменяются вследствие длительного употребления алкоголя, а именно, уровень глутатиона, малонового диальдегида, окисленных форм кислорода (ROS), содержание в печени некоторых витаминов и коферментов, в частности B_1, PP, тиаминдифосфата, фолиевой кислоты в крови, убихинона (коэнзима Q) в сердечной мышце, активность ключевых энзимов энергетичекого метаболизма. На всех экспериментальных моделях эффект препарата "Метовитан" на 30-35% превосходил эффект метионина. Показательным является действие препарата на модели отмены алкоголя (абстиненции). В этих условиях его введение способствовало значительно более быстрой по сравнению с контролем нормализации содержания восстановленного глутатиона (SH-групп) и уровня ROS в тканях. Помимо позитивного влияния на систему антиоксидантной защиты клеток, введение препарата животным с моделью абстиненции значительно ускоряло восстановление других биохимических показателей, в частности, активность ацетилхолинэстеразы, алкогольдегидрогеназы, комплексов дегидрогеназ оксо-кетокислот. Следует отметить, что длительный прием алкоголя приводил к катастрофическому снижению в тканях содержания убихинона и фолиевой кислоты как следствие угнетения в этих условиях процессов трансметилирования. При отмене приема алкоголя эти показатели на протяжении недели нормализовались только в группе животных, которым вводили "Метовитан". Гистологические исследования подтвердили высокую эффективность исследуемого препарата в регенерации паренхимы печени.

На основании полученных результатов препарат "Метовитан" может быть рекомендован в качестве препарата сопровождения при применении лекарственных средств, проявляющих гепатотоксические свойства, а также в схеме лечения больных алкогольной или наркотической зависимостью.

STUDY OF HEPATOPROTECTIVE ACTION OF THE "METOVITAN"

Donchenko G.V., Parkhomenko Yu.M., Bekkerman A.M.

Palladin Institute of Biochemistry NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: yupark@biochem.kiev.ua; dongv@biochem.kiev.ua

Complex vitamin preparation "Metovitan" was designed on the basis of the results of fundamental studies on the functional relationship between metabolism of vitamins and metabolism of other biologically active compounds, which are carried out at the Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine. The ratio of ingredients in this preparation strictly selected to create the conditions in the tissues of the body for activation of the metabolism of exogenous methionine (a component of the drug) on the way of transsulfurization and transmethylation. Activation of these processes contributes to the synthesis of glutathione - a natural peptide, which is an important component of the biochemical antioxidant protection system of the body and is involved in detoxification reactions of xenobiotics.

High detoxicating action of the drug in relation to xenobiotics shown in several experimental models, in particular, on the model of acute poisoning with tetrachloroethane in rats, a model drug hepatitis (in rats at a dose of paracetamol ½ LD50), in various experimental models of alcoholism. Methionine was used as a reference drug. Effect of the drug "Metovitan" on the biochemical parameters in the conditions of chronic alcohol consumption (the contents of rats for 4-5 months on 15% ethanol solution) was studied in most detail. "Metovitan " was injected to rats orally using a probe for 5 days before the end of the experiment.

Effectiveness of the drug had been analysed by its ability to normalize biochemical parameters that are critical change due to long-term use of alcohol, namely, the level of glutathione, malondialdehyde, reactive oxygen species (ROS), content in the liver of some vitamins and coenzymes, in particular B_1, PP, thiamine diphosphate, folic acid in blood, ubiquinone (coenzyme Q) in the heart muscle, the activity of key enzymes energy metabolism. Effect of the drug "Metovitan" was on 30-35% superior to methionine in all experimental models. Effect of the drug on the model of alcohol withdrawal (abstinence) is the most pronounced. Under these conditions, its introduction has contributed significantly faster compared to the control normalization of reduced glutathione (SH-groups) and the level of ROS in tissues.

In addition to the positive effect on the antioxidant defense system of cells, the introduction of the drug to animals with a model of abstinence significantly accelerated the recovery of other biochemical parameters, in particular, the activity of acetylcholinesterase, alcohol dehydrogenase, complexes of oxo-ketoacid dehydrogenase. It should be noted that the prolonged use of alcohol leads to a catastrophic reduction in tissues content of ubiquinone, and folic acid as a consequence of oppression in these conditions, transmethylation processes. When the alcohol was removed , these biochemical parameters during the week were normalized only in the group of animals injected with "Metovitan". Histological studies confirmed the high efficiency of the drug in the regeneration of liver parenchyma.

Based on these results the drug "Metovitan" can be recommended as a drug support in the using of drugs that exhibit hepatotoxic properties, as well as in the treatment of patients with alcohol or drug addiction.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СИСТЕМ ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ БАЛАНСА СТАЦИОНАРНЫХ ПОТОКОВ

Доценко О.И.

Донецкий национальный университет, Донецк, Украина
e-mail:dots_don@ukr.net

Эритроциты человека являются предметом не только интенсивного экспериментального изучения, но и математического моделирования, так как эти клетки имеет высокую медицинскую значимость, доступны, и их метаболизм относительно прост. Известно, что эритроциты человека не в состоянии синтезировать АТФ de novo. Однако, они используют метаболические маршруты, в которых нуклеозиды или основания могут быть переработаны с образованием АТФ. Точная структура путей, приводящих к стабилизации уровня АТФ в клетке, не была еще детально проанализирована. Эффективным подходом, позволяющим построить модель метаболизма клетки в целом, является метод баланса стационарных метаболических потоков. Этот подход отличается от кинетического тем, что при нём моделируется не изменение концентраций метаболитов во времени, а картина распределения скоростей метаболических реакций.

Таким образом, данная работа является обобщением теоретических (математического моделирования) и экспериментальных результатов исследования путей регуляции гликолиза, взаимодействия энергетического метаболизма с системой производства восстановителей.

Теоретически, используя концепцию элементарных потоков и метод баланса стационарных метаболических потоков, найдены элементарные пути, которые могут быть реализованы в эритроцитах при адаптации к изменениям внешних условий без существенного нарушения метаболизма. Оценен вклад отдельных стадий гликолиза в энергетический и редокс метаболизм клетки, а также показано, каким метаболическим путям отдает предпочтение клетка для сохранения своей целостности. Вычислена стехиометрия образования АТФ в процессах ресинтеза. Анализ количества элементарных способов потоков и оценка скоростей реакций методом баланса стационарных потоков выполнены с использованием программы CellNetAnalyzer 6.2.

Экспериментально были измерены регуляторные характеристики пути Эмбдена-Мейергофа и пентозофосфатного пути для эритроцитов, подвергавшихся воздействию различных доз аллоксана (10^{-4} – 10^{-15} моль/л). В докладе будут проанализированы следующие экспериментальные данные:

1. зависимости содержания АТФ, неорганического фосфата, 2,3-ДФГ от концентрации аллоксана в пробе и времени инкубирования;

2 зависимости содержания восстановленного глутатиона в эритроцитах и активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы от концентрации аллоксана в пробе и времени инкубирования для анализа вклада окислительных процессов и гексозо-монофосфатного пути в метаболизм эритроцитов;

3. зависимости активности Na-K-зависимой АТФ-зы эритроцитов для оценки скорости (активности) АТФ-потребляющих процессов в клетке.

4. зависимости активности лактатдегидрогеназы эритроцитов для оценки скорости последней стадии гликолиза.

5. зависимости активности фосфогексоизомеразы эритроцитов в зависимости от концентрации аллоксана в пробе и времени инкубирования.

Полученные экспериментальные данные подтверждают наличие путей регуляции и стабилизации производства восстановительных и энергетических эквивалентов в эритроцитах.

В практическом аспекте анализ регуляторных характеристик поможет понять истинные причины ухудшения жизнеспособности эритроцитов при воздействии на них факторов различной природы. Дефициты ферментов метаболических путей, играющих важную роль в стабилизации уровня АТФ и восстановительных эквивалентов, могут влиять на уровень ключевых метаболитов и тем самым на стойкость эритроцитов.

THE RESEARCH OF REGULATION MECHANISMS OF ERYTHROCYTES METABOLIC SYSTEMS USING THE STEADY-STATE FLUX BALANCE METHOD

Dotsenko O.I.

Donetsk national university, Donetsk, Ukraine
e-mail:dots_don@ukr.net

The human erythrocytes have been a subject not only of intense experimental research but also of many modeling studies because of high medical relevance, accessibility and simple metabolism. It is known, that human red blood cells are not able to synthesize ATP de novo. However, they use metabolic pathways by which nucleosides or bases can be recycled to ATP. The exact metabolic pathways structure, which leads to stabilization of ATP level in a cell, has not yet been analyzed in detail. The effective approach, allowing constructing cell metabolic model generally is the method of steady-state flux balance. This approach differs from the kinetic the fact that simulated not the changing of metabolites concentration in time, and the rate distribution pattern of metabolic reactions.

Thus, the given work is generalization of theoretical (mathematical modeling) and experimental research results of glycolysis pathways regulation, the interactions of an energy metabolism with reducers production system.

Theoretically, using the concept of elementary flux modes and a method of flux balance analysis, elementary pathways which can be realized in erythrocytes at adaptation to changes of external conditions without essential disorder of a metabolism are found. The contribution of single glycolysis stages in energy and redox cell's metabolism is estimated, and also is shown, what metabolic pathways are preferred by a cell for the integrity preservation. The overall stoichiometry of ATP build-up from the recycled substrates computed. The analysis of quantity of elementary flux pathways and estimation rates of reactions are executed by the steady-state flux balance method using the program CellNetAnalyzer 6.2.

The regulatory characteristics of Embden-Meyerhof pathway and pentose-phosphate pathway for erythrocytes, exposed to the influence of various doses of alloxan (10^{-4}-10^{-15} M) have been measured experimentally. In the report following experimental data will be analyzed:

1. Dependencies of ATP, inorganic phosphate, 2,3-DPG content from alloxan concentrations in probes and from time incubation;

2 Dependencies of the reduced glutathione content in erytrocytes and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity from alloxan concentrations in probes and time incubation for the analysis of the contribution of oxidizing processes and a pentose-phosphate pathway to the erytrocytes metabolism;

3. Dependencies of erytrocytes Na-K-dependent ATPase activity for an estimation of speed (activity) of ATP-consuming processes in cell.

4. Dependencies of erytrocytes lactate dehydrogenase activity for an estimation of speed of glycolysis last step.

5. Dependencies of erytrocytes phosphoglucoisomerase activity from alloxan concentrations in probes and incubating time.

The received experimental data confirm the presence of regulation pathways and stabilization of reducers and energy equivalents production in erytrocytes.

In practical aspect the analysis of regulatory characteristics will help to understand the true reasons of deterioration of erytrocytes viability at influence of the various nature factors. Deficiencies of metabolic pathways enzymes playing an important role in stabilization of ATP and reducers equivalents level can influence on key metabolites level and by that on erytrocytes stability.

ВЛИЯНИЕ ОЗОНА НА СВОЙСТВА АЛЬБУМИНА ПЛАЗМЫ ПАЦИЕНТОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ОЗОНОТЕРАПИИ

[1,2]ДюбкоТ.С., [2]Соколик О.А., [3]Козин Ю.И., [4]Посохов Н.Ф.

[1] Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина
e-mail: tdyubko@mail.ru
[2] ГНУ НТК «Институт монокристаллов НАН Украины», Харьков, Украина
[3] Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина
[4] Харьковский региональный противоболевой центр, Харьков, Украина

При проведении процедур озонотерапии важна своевременная оценка состояния белков плазмы крови и в особенности ее основного белкового компонента – альбумина на различных этапах поведения процедур. Традиционные методы являются достаточно трудоемкими и, кроме того, изменение связывающей способности альбумина не регистрируется рутинными биохимическими методами [1, 2]. Количество и связывающая способность альбумина плазмы могут быть адекватным экспресс-тестом эффективности процедур озонотерапии. Одним из перспективных подходов к изучению связывающей способности альбумина является флуоресцентное зондирование с применением зондов, преимущественно взаимодействующих с альбумином в плазме крови.

В работе с применением известных и новых флуоресцентных зондов исследовали динамику изменения показателей общей (ОКА) и эффективной (ЭКА) концентрации альбумина, а также отношения ЭКА/ОКА, отражающего заполненность альбумина токсическими лигандами [1, 2] при проведении процедур озонотерапии у пациентов в возрасте от 22 до 75 лет, находящихся на амбулаторном лечении в Харьковском противоболевом центре (всего 29 образцов), страдающих различными заболеваниями (сердечно-сосудистые патологии, урогенитальные инфекции, сахарный диабет, вегето-сосудистая дистония и др.).

Для определений использовали синтезированный нами «альбумин-специфичный» зонд К-35 [1, 2], испускающий в видимой области спектра (450-650 нм). На возможность применения для оценки связывающей способности альбумина были протестированы также новые сквараиновые красители серии К8 (К8-1400, К8-1500), имеющие высокое сродство к альбумину и флуоресцирующие в длинноволновой области спектра (600-750 нм). Показатели ЭКА и ОКА определяли с помощью набора реактивов “Зонд-Альбумин” (Россия) на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian). Озон в дозах от 2 до 25 мг/л вводили в кровяное русло в виде физиологического раствора, насыщенного озоново-кислородной смесью (ОФР) или озонированной аутокрови пациента (большая аутогемоозонотерапия, БАГОТ).

Установлена зависимость эффективности терапии от вида применяемой процедуры (ОФР или БАГОТ), от вида и тяжести заболевания и исходного уровня эндогенной интоксикации пациентов. После первичного введения озона в минимальной (2 мг/л) дозе наблюдалось достоверное снижение отношения ЭКА/ОКА у всех больных, выраженность которого зависела от вида патологии. После первой процедуры как правило наблюдалось снижение показателя ОКА в плазме. Рост показателей ОКА и ЭКА, особенно рост эффективной концентрации альбумина, наблюдался к 5-12-й процедуре. При этом, внутривенное введение озонированной аутокрови (БАГОТ) оказывало более выраженный эффект на динамику изменения показателей ЭКА и ОКА по сравнением с ОФР. Направление изменений показателей ОКА и ЭКА находится в хорошем соответствии с определенными независимыми методами содержанием общего белка и изменениями общей антиоксидантной активности плазмы (АОА) [3].

Наблюдаемое снижение общего содержания альбумина плазмы у больных свидетельствует о преобладании катаболических процессов на начальном этапе озонотерапии, сопровождающееся повышенным содержанием в плазме крови токсических лигандов, в т.ч. образованных в результате взаимодействия с белками плазмы озона и продуктов его распада. Рост показателей ЭКА и ОКА по мере увеличения числа процедур по-видимому отражает начавшийся процесс компенсации детоксикации и начало преобладания анаболических процессов в организме при приближении к завершению курса. Причиной обнаруженной неодинаковой устойчивости САЧ к действию озона при исследованных патологиях может быть исходно различная степень нагруженности молекул альбумина токсическими лигандами.

Тестирование «длинноволновых» зондов К8-1400 и К8-1500 показало, что они хорошо связываются как с изолированным альбумином, так и с альбумином плазмы, что нашло свое отражение в многократно увеличении интенсивности их флуоресценции и могут быть с успехом использованы для определения общей концентрации альбумина в плазме. В то же время, добавление в систему детергента, используемого в методе определения ЭКА и ОКА, не привело к дополнительному росту интенсивности флуоресценции как это имеет место при использовании зонда К-35 [1, 2]. Напротив, интенсивность флуоресценции снижалась. Этот эффект может быть связан с конкуренцией зондов и детергента за сайты связывания на белке и требует дальнейшего изучения.

Литература:

1. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. Под ред. Ю.А. Грызунова и Г.Е. Добрецова. М: Ириус 1994; С. 91-105.
2. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. Под ред. Ю.А. Грызунова и Г.Е. Добрецова. М: ГЭОТАР 1998; 440 с.
3. *Дюбко Т.С., Зинченко В.Д., Козин Ю.И. и др.* Дозозависимое действие озона на белки крови в изолированном состоянии и при введении в организм // Тез докл. «Биологически активные вещества: фундаменталные и прикладные вопросы получения и применения».- Новый Свет, Крым, Украина.- Киев, 2009.- С. 265.

IMPACT OF OZONE ON SERUM ALBUMIN OF PATIENTS TREATED BY OZONOTHERAPY

[1,2]Dyubko T.S., [2]Sokolyk O.O., [3]Kozin Yu.I., [4]Posokhov N.F.

[1] Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Ukr. Natl. Acad. Sci., Kharkov, Ukraine
e-mail: tdyubko@mail.ru
[2] State Scientific Institution "Institute for Single Crystals", Ukr. Natl. Acad. Sci., Kharkov, Ukraine
[3] Kharkov National Medical Univerity, Kharkov, Ukraine
[4] Kharkiv's Regional Antipainful Center, Kharkov, Ukraine

A prompt assessment of the state of blood plasma proteins particularly albumin is required at different stages of ozonotherapy. Traditional biochemical methods are quite laborious but also do not allow to estimate the albumin binding ability [1, 2]. Serum albumin is responsible for a transport of a wide range of exogenic and endogenic substances in blood stream while its ability to bind low-molecular-weight ligands can be affected by various pathological states coursing organism intoxication. During ozonotherapy it is important to adequately estimate the change of both total and effective albumin concentration, i.e. to detect the amount of albumin that is able to actively detoxicate organism and carry out its transportation action. Determination of both albumin concentration and binding ability can be used as an adequate rapid assay to estimate the ozonotherapy efficiency. A fluorescence based assay utilizing albumin-sensitive fluorescent probes is one of the most promising ways to study albumin binding efficiency.

Using some known and new fluorescent probes this work investigates change of the total (TAC) and effective (EAC) albumin concentration as well as EAC/TAC ratio indicating the number of toxic ligands per albumin molecule [1, 2]. The investigation was done for twenty-nine 22–75 years old outpatients with cardiovascular, urogenital, diabetes mellitus, vegeto-vascular dyskinesia, and some other pathological states treated at the Kharkiv's Antipainful Center.

K-35 [1, 2] was used as the reference albumim-specific fluorescent probe. K-35 absorbs at about 450 nm and emits at 500-650 nm. We investigated applicability of new fluorescent probes K8-1400 and K8-1500 available from SETA BioMedicals (www.setabiomedicals.com) to estimate albumin binding ability. These probes absorb and emit between 600–750 nm and exhibit strong affinity to albumin. The TAC and EAC parameters were determined using Albumin-Probe kit (Russia). The measurements were carried out using a Varian Cary Eclipse spectrofluorometer. Ozon (from 2 to 25 mg/l) was injected in blood stream using two methods: (i) as physiological solution saturated with mixture of ozone with oxygen (OPS method) or (ii) as ozonated patient authoblood (Major Authohemoozonotherapy, MAHOT).

The ozonotherapy courses were found to have different impact on the TAC and EAC. The therapy efficiency is dependent upon the used method (OPS or MAHOT), kind and gravity of disease, and the initial level of patient's endogenous intoxication. After the first procedure of ozonotherapy course, which consisted in the introduction of 2 mg/l ozone, a noticeable decrease of both TAC and EAC/TAC ratio was observed for all patients. The decrease was found to depend upon the kind of pathology. At the same time an increase of the TAC and especially EAC was observed after 5 to 12 ozonotherapy procedure. Compared to OPS, the MAHOT coursed stronger effect on the EAC and TAC. The direction of EAC and TAC changes (increase or decrease) is in good agreement with the plasma total protein level and total plasma antioxidant activity (AOA) determined by the independent methods described elsewhere [3].

The observed TAC decrease evidences that catabolic processes at the ozonotherapy initial stage predominates, which is accompanied by an increase of the toxic ligands level in blood plasma particularly the ligands generated by interaction of ozone with plasma proteins and the ozone decomposition products. The increase of the TAC and EAC with the increase of the number of ozonotherapy procedures apparently reflects the process of detoxicating indemnification and the beginning of anabolic processes prevalence in organism at approach to course end. Different initial degree of binding of albumin molecules with toxic ligands can be the reason for discrepancy in albumin stability towards ozone *versus* the kind of pathology.

The long-wavelength, high affinity probes K8-1400 and K8-1500 exhibit a pronounced fluorescence increase when bound to both isolated and plasma albumin, which can be used to determine the TAC in plasma. In contrast to the K-35 based EAC and TAC assays [1, 2], an addition of the detergent, reduces the fluorescence intensity increase, which is more likely connected with a competition of probe and detergent for albumin binding sites. This effect should be further investigated.

References:

1. Blood serum albumin in clinical medicine // Yu.A.Gryzunov and G.E.Dobretsov Eds.- Moscow: Irius, 1994.- P. 91-105.
2. Blood serum albumin in clinical medicine // Yu.A.Gryzunov and G.E.Dobretsov Eds.- Book 2.- Moscow: GEOTAR, 1998.- 440 p.
3. *Dyubko T.S., Zinchenko V.D., Kozin Yu.I. et al.* Dose-depended ozone effect on blood proteins in isolated state and under ozone introduction into organism // Scientific conference "Biologically active substances: Fundamental and Applied Problems.- Novy Svet, AR Crimea, Ukraine, May 25-30, 2009.- Kiev, 2009.- P. 266.

О ПЕРСПЕКТИВАХ РАЗРАБОТКИ НОВОГО ОРГАНОПРЕПАРАТА ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО НЕФРОЛИТИАЗА

Жариков А.Ю., Зверев Я.Ф., Брюханов В.М., Лампатов В.В.

ГОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет Росздрава, Барнаул, Россия
e-mail: zharikov_a_y@mail.ru

Нефролитиаз – распространенное урологическое заболевание, проблема поиска новых методов фармакологической коррекции которого сегодня актуальна. При этом в процессе их поиска предпочтение отдается препаратам биологического происхождения. В данном контексте нас заинтересовала перспектива разработки органопрепарата из свиных почек, поскольку хорошо известно, что эти животные практически не болеют мочекаменной болезнью. Таким образом, целью настоящего исследования стало изучение влияния сырья из свиных почек на течение экспериментального нефролитиаза.

Эксперименты проведены на двух группах крыс (контрольная и подопытная), по 15 животных в каждой, которые с целью моделирования нефролитиаза 6 недель получали в виде питья 1%-ный раствор этиленгликоля (ЭГ). В подопытной группе, начиная с 4-й недели, на протяжении последующих 3-х недель в пищевой рацион добавлялся гомогенат из сырых свиных почек в дозе 5 г на крысу. Каждые 3-4 дня в суточной моче определялась концентрация оксалат-ионов и ионов кальция, а также измерялась активность маркерных ферментов повреждения почечного эпителия: лактатдегидрогеназы (ЛДГ), γ-глютамилтрансферазы (ГГТ) и N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (НАГ). По истечении 6 недель крысы обеих групп декапитировались, после чего у них производился забор почек для морфологического исследования гистохимическим методом Косса на предмет наличия кальций-позитивного материала. Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась по методу парных сравнений с использованием критерия Манна-Уитни.

Проведенные эксперименты показали, что в контрольной группе, где крысы 6 недель получали в виде питья раствор ЭГ, были зафиксированы характерные признаки развития нефролитиаза. Так, наблюдалось пересыщение мочи оксалат-ионами (от 1,0 мг/мл до 1,7 мг/мл на протяжении 6 недель опыта), в то время как до начала применения ЭГ анионы щавелевой кислоты в моче не выявлялись. Кроме того, отмечался ярко-выраженный рост ферментативной активности, в результате чего к 42 дню активность ЛДГ увеличилась в 5,6 раза; ГГТ – в 2,9 раза; НАГ – в 4,5 раза (для всех – $p<0,001$). Концентрация ионов кальция в моче в течение всего периода наблюдений была стабильной: 1,3-1,8 мкмоль/мл. Морфологические исследования показали, что в почках крыс контрольной группы, 6 недель потреблявших ЭГ, произошло формирование в области почечного сосочка значительного количества кальциевых депозитов (22,6±3,23 в поле зрения), средний размер которых составил 10,2±0,73 мкм.

В подопытной группе в первые 3 недели применения ЭГ также наблюдались вышеперечисленные признаки развития нефролитиаза: пересыщение мочи оксалат-ионами и увеличение активности в моче маркерных ферментов. На этом фоне применение сырья из свиных почек привело к существенному облегчению протекания экспериментальной патологии. Было установлено, что во время проводимого лечения в 1,7-2,4 раза относительно контроля снижалась мочевая концентрация оксалат-ионов (до 0,5-0,7 мг/мл; $p<0,001$). Параллельно на 33-50% по сравнению с крысами контрольной группы уменьшалась концентрация в моче ионов кальция (0,8-1,0 мкмоль/мл; $p<0,001$). Кроме того, происходило последовательное снижение активности маркерных ферментов вплоть до уровня здоровых крыс к последнему дню опыта. В это время активность ЛДГ была ниже контрольных значений в 1,7 раза; ГГТ – в 2 раза; НАГ – в 6,3 раза (для всех $p<0,001$). Наконец, результаты морфометрии показали, что в результате трехнедельного применения сырья из свиных почек количество кальциевых депозитов уменьшилось в 2,6 раза (с 22,6±3,23 до 8,6±0,92 в поле зрения; $p<0,001$), а их средний размер – в 1,5 раза (с 10,2±0,73 мкм до 6,6±0,32 мкм; $p<0,001$).

Таким образом, установлено, что применение сырья из свиных почек существенно облегчает течение экспериментального нефролитиаза. Характерными признаками антилитогенного действия стали ослабление пересыщения мочи оксалат-ионами, восстановление структуры и функции почечного эпителия, а также уменьшение количества и размеров кальциевых депозитов. Полученные результаты открывают перспективы для создания нового эффективного органопрепарата для лечения мочекаменной болезни.

ABOUT PERSPECTIVES OF NEW ORGAN'S DRUG DEVELOPMENT FOR THE EXPERIMENTAL NEPHROLITHIASIS PHARMACOLOGICAL CORRECTION

Zharikov A.Yu., Zverev Ya.F., Bryukhanov V.M., Lampatov V.V.

Altay state medical university of Roszdrav, Barnaul, Russia
e-mail: zharikov_a_y@mail.ru

Nephrolithiasis – widespread urological disease, which problem of new pharmacological correction's methods search is actually. In process of this search preference is given to drugs of a biological origin. In the given context of us has interested perspective of drug from pork kidneys development. Thus, the aim of present investigation was studying of raw material's from pork kidneys effect on the experimental nephrolithiasis.

Experiments were performed on 2 rats groups (control and experimental), on 15 animals in everyone, which during 6 weeks was given 1% solution of ethylenglycole (EG) as a drink for rats to modeling of nephrolithiasis. In experimental group from the 4-th week was being administrated raw material from pork kidneys in dose 5 g/rat. Every 3-4 days in daily urine's portion was being detected of oxalate's and calcium's concentrations, activity of urothelium injury's marker enzymes: lactate dehydrogenase (LDH), γ-glutamyl transferase (GGT), N-acetyl-β-D-glucose aminidase (NAG). Moreover, in rats kidney's cuts was being detected calcium deposits by hystochemistry Van Koss method.

Chronic use of EG in control group has resulted in oxalate nephrolithiasis progression which was indicated by oxalate's urine supersaturation (from 1,0 mg/ml to 1,7 mg/ml during 6 weeks of experiment), whereas before EG oxalates in urine did not detected. Moreover, registered enhancing of marker enzymes activity, as a result of those LDG activity enhanced in 5,6 times; GGT – in 2,9 times, NAG – in 4,5 times (for everyone – $p<0,001$). Urine calcium's concentration was stable during experiment: 1,3-1,8 mkmole/ml. Morphological research showed numerous calcium deposit's formation (22,6±3,23 in the window) near renal papilla, which mid-size was 10,2±0,73 mkm.

In experimental group during first 3 weeks also observed nephrolithiasis symptoms: urine oxalate's supersaturation and enhancing of marker enzymes activity. On this way administrated of raw material from pork kidneys led to significant reduced of nephrolithiasis. In 1,7-2,4 times decreased urine oxalate's concentration in regard to control during the treatment (to 0,5-0,7 mg/ml; $p<0,001$). At the same time on 33-50% decreased calcium urine concentration in comparison of control rats (0,8-1,0 mkmole; $p<0,001$). Moreover, observed consecutive reduction enzymes activity to the healthy rats level. At this tame LDG activity was below control values in 1,7 times; GGT – in 2 times; NAG – in 6,3 times (for everyone – $p<0,001$). Finally, morphological research results demonstrated decreasing of calcium deposits number in 2,6 times (from 22,6±3,23 до 8,6±0,92 in the window; $p<0,001$) and there mid-size in 1,5 times (from 10,2±0,73 мкм до 6,6±0,32 mkm; $p<0,001$).

Thus, it was concluded, that exhibition of raw material from pork kidneys significant reducing of nephrolithiasis symptoms. Characteristic attributes of antilitogenic action was urine oxalate supersaturation's relief, recovery of renal epithelium structure and functions, reduction of calcium deposits number and mid-size. Those results offer the challenge to creating new effective organ's drug for stone kidney disease treatment.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ШАПЕРОН/ШАПЕРОНИН HSP60 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ АГЕНТ ПРИ РАКЕ ПИЩЕВОДА

[1]Зайцев С.Л., [1]Ганул В.Л., [2]Капустян Л.Н., [2]Рожко О.Т., [3]Литвин Д.И., [3]Дудченко Т.И., [3]Погребной П.В., [2]Сидорик Л.Л.

[1]Национальный Институт рака МОЗ Украины, Киев
[2]Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев
e-mail: sidorik@imbg.org.ua
[3]Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им.Кавецкого НАН Украины, Киев

Различные виды физиологического стресса (от ишемии до генных мутаций) вызывают развитие патологий, в которых общей характерной чертой является нарушение корректной укладки (фолдинга) белков. Специализированное семейство высококонсервативных антистрессовых белков - молекулярных шаперонов - защищает клетки от различных видов стресса связыванием частично денатурированных белков, диссоциацией белковых агрегатов и регуляцией корректного фолдинга. Экспрессия шаперонов индуцируется и при различных физиологических процессах, таких как клеточное деление, апоптоз, активация факторов роста, клеточная дифференциация, гормональная стимуляция, сигнальная трансдукция, презентация внутриклеточных антигенов, и представляет собой основной фактор контрольного механизма качества белков .

Молекулярные шапероны вовлечены в развитие множества патологий (от аутоиммунных до раковых) посредством изменения уровня их экспрессии, посттрансляционных модификаций и клеточной локализации.

Среди них шаперонин Hsp60, который детектируются в крови многих пациентов и здоровых людей, занимает особое место как потенциальный провоспалительный агент – лиганд Toll-like рецепторов. Ранее было показано изменение уровня экспрессии Hsp60 при раке молочной железы , раке шейки матки , миелоидной лейкемии , раке прямой кишки, раке щитовидной железы, что коррелировало с хорошим прогнозом и чувствительностью к химиотерапии. Однако, описано снижение экспрессии Hsp60 в опухолях, ассоциированное с плохим прогнозом и резистентностью к химиотерапии, при раке яичников, печени, простаты и при остеосаркомах. Присутствие аутоантител против Hsp60 (и некоторых других шаперонов) в сыворотках онкопациентов может быть информативным добавочным онкомаркером.

Нами исследованы особенности экспрессии молекулярного шаперона Hsp60 как аутоантигена при развитии рака пищевода. Методом иммуноблоттинга с помощью полученных нами анти-Hsp60 моноспецифических антител обнаружено изменение количественной экспрессии шаперонина Hsp60 при развитии рака пищевода. Снижение уровня экспрессии Hsp60 в опухолях пищевода по сравнению с нормальной тканью коррелировало с повышением уровня сывороточных анти-Hsp60 аутоантител. Ранее нами было показано, что при гормон-зависимых видах рака (рак молочной железы и щитовидной железы) уровень Hsp60 в данных опухолях значительно возрастал по сравнению с нормальной тканью, что коррелировало как с плохим прогнозом, так и с химиорезистентностью у большинства исследуемых пациентов.

На основе собственных оригинальных исследований и анализа литературных данных нами сформулирована рабочая гипотеза об особенностях экспрессии и функциональной активности молекулярных шаперонов при разных видах рака. Дальнейшие детальные исследования особенностей экспрессии Hsp60 в опухолях пищевода и как аутоантигена позволят приблизиться к пониманию молекулярных механизмов прогрессии рака пищевода и роли аутоиммунных процессов при данной патологии, а также могут служить основой для создания нового типа диагностикума риска рецидивов рака пищевода.

MOLECULAR CHAPERON/CHAPERONIN HSP60 AS A NEW DIAGNOSTIC TOOL AT ESOPHAGUS CANCER

[1]Zaitsev M, [1]Ganul V., [2]Kapustian L., [2]Rozhko O., [3]Lytvin D., [3]Dudchenko T., [3]Pogribnyi P., [2]Sidorik L.

[1]National Cancer Institute Ministry of Health of Ukraine, Kyiv, Ukraine
[2]Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: sidorik@imbg.org.ua
[3]Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Physiological stresses (heat, hemodynamics, genetic mutations, oxidative injury and myocardial ischemia) produce pathological states in which protein damage and misfolded protein structures are a common denominator. The specialized proteins' family of antistress proteins – molecular chaperons (HSPs) – are responsible for correct protein folding, dissociating of protein aggregates and transport of newly synthesized polypeptides to the target organelles for final package, degradation or repair. They are inducible at different cell processes such as cell division, apoptosis, signal transduction, cell differentiation and hormonal stimulation. HSPs are involved in numerous diseases including cancer, revealing changes of expression and cell localization.

Molecular chaperon (chaperonin) Hsp60 detected in circulation of vajority of patients and healthy subjects as well. Hsp60 is a special interest as a recently described ligand for Toll-like receptors with pro-inflammation activity. Recently significant increase in Hsp60 expression have been observed at breast cancer, cervix cancer, myeloid leukemia, colorectal cancer, thyroid cancer and reveiled the positive correlation with drug-sensitivity and good prognosis. Alternatively, the Hsp60 expression decrease associated with poor prognosis in ovarian, gastric, liver and prostate cancer, and osteosarcomas. The presence of Hsps and autoantibodies to the Hsps in the serum of cancer patients are of significance as additional tumor markers.

We study the peculiarities of Hsp60 expression at autoantigen at esophagus cancer progression. We observed Hsp60 expression decrease in esophagus tumors by Western-blot analysis using anti-Hsp60 monospecific antibodiesd developed in IMBG NASU. Hsp60 level changes are correlated with elevation of anti-Hsp60 autoantibodies level in patients sera in comparison with healthy donors. Recently we observed the significant increase of Hsp60 expression in thyroid and breast tumors which correlated with poor prognosis and drug-resistance in majority of such patients.

Taking into account our original data and literature data analysis we proposed a hypothesis concerning peculiarities of Hsp60 expression and functioning link with autoimmune and apoptiotic processes at different cancer types. This could be a theoretical base for development of new diagnostic and therapeutic tools.

ВПЛИВ СИНТЕТИЧНИХ І ПРИРОДНИХ ІНГІБІТОРІВ/МОДУЛЯТОРІВ ОБМІНУ ПОЛІАМІНІВ НА РОЗВИТОК ЛІМФОЛЕЙКОЗУ L1210 У ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН ТА ЗАГАЛЬНЕ МЕТИЛЮВАННЯ ДНК, ОБМІН ПОЛІАМІНІВ І ЕКСПРЕСІЮ В ЛЕЙКОЗНИХ КЛІТИНАХ БІЛКІВ, ПРОДУКТІВ ГЕНІВ, ЗАЛУЧЕНИХ В ПРОЦЕСИ ПРОЛІФЕРАЦІЇ ТА АПОПТОЗУ

Залєток С.П., Шляховенко В.О., Орловський О.А., Гоголь С.В., Самойленко О.А., Кленов О.О., Яніш Ю.В., Вербиненко А.В., Міліневська В.О., Карнаушенко О.В., Малашко Л.І.

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України, Київ
e-mail: sophiazaletok@mail.ru

Мета роботи: вивчити вплив синтетичних та природних інгібіторів/модуляторів метаболізму поліамінів (ПА) на характер метилювання ДНК в лейкозних клітинах та експресію білків, продуктів генів, залучених в процеси проліферації і апоптозу.

***Методи*:** електрофоретичний аналіз ДНК, гель-електрофорез білків, Вестерн-блот аналіз, метод поверхневого плазмонного резонансу (ППР), метод рідинної хроматографії, флюориметричні, біохімічні, імуногістохімічні, методи експериментальної онкології та методи статистики.

Результати. Досліджено дію α-дифторметилорнітину (α-ДФМО), полігексаметиленгуанідину (ПМГ), поліфенолів зеленого чаю **(**ПФЗЧ) та інших модифікаторів обміну поліамінів (орнітинового комплексу ($Cu(Orn)_2$) і суспензії наночастинок оксиду заліза (Fe_3O_4)) та вплив цих агентів при спільному їх застосуванні на проліферацію клітин лімфолейкозу L1210 у черевній порожнині мишей, вплив на загальне метилювання ядерної ДНК, вміст ПА і їх ацетильованих форм, рівень білка ОДК та експресію білків, продуктів генів *p53, c-myc* та *bcl-XL* в пухлинних клітинах. Виявлено, що введення α-ДФМО (800 мг/кг маси в черевну порожнину або при споживанні тваринами 2% розчину α-ДФМО в питній воді) та ПФЗЧ (0,1% розчин в питній воді), як і спільне введення α-ДФМО і ПФЗЧ, майже не впливало на об'єм асцитної рідини у тварин і, разом з тим, призводило до суттєвого зменшення (у 1,85 - 2,3 рази) кількості лейкозних клітин у асцитній рідині. Як α-ДФМО, так і ПФЗЧ суттєво підвищували середню тривалість життя тварин. При вивченні дії інших модифікаторів обміну поліамінів на проліферацію лейкозних клітин було виявлено, що найбільш виражений гальмівний вплив справляє ПМГ. Кількість клітин у черевній порожнині тварин цієї групи, в середньому, на 63% менша, порівняно з контролем. Гальмівну дію, хоч і значно меншу, проявляли ($Cu(Orn)_2$-комплекс (40%), та наночастинки Fe_3O_4 (30,2%).

Виявлено, що блокування синтезу поліамінів шляхом застосування α-ДФМО і інших досліджуваних агентів, призводить до помітного зростання рівня загального метилювання ядерної ДНК в лейкозних клітинах.

Встановлено, що ПФЗЧ, ПМГ та α-ДФМО призводять до підвищення експресії в клітинах лімфолейкозу L1210 білка p53, зниження рівня експресії орнітиндекарбоксилази (ОДК) – ключового фермента синтезу поліамінів та білків, продуктів генів *bcl-xl* і *c-myc*. Виявлено також, що поєднане введення тваринам α-ДФМО і ПФЗЧ призводить до зниження в клітинах лімфолейкозу L1210 рівнів експресії білків bcl-xl, iNOS і c-myc.

Виявлено, що α-ДФМО, при введенні його тваринам з питною водою (2% розчин), призводить (в порівнянні з інтраперитонеальним його введенням в дозі 800 мг/кг маси) до більш значного зниження рівня не тільки путресцину, а й до різкого зменшення рівня спермідину в лейкозних клітинах. Введення тваринам ПМГ призводило до зниження (в 2,3 рази) вмісту путресцину в лейкозних клітинах та зменшення (на 17%) вмісту спермідину. Введення тваринам $Cu(Orn)_2$ та спільне введення ПМГ і ПФЗЧ призводило до підвищення рівня ацетильованого спермідину (Ац-спд) та зниження рівня путресцину, порівняно з контрольними показниками.

Висновок. Встановлено, що синтетичні та природні інгібітори/модулятори обміну поліамінів (ДФМО, ПМГ, $Cu(Orn)_2$, поліфеноли зеленого чаю) суттєво гальмують розвиток лімфолейкозу L1210 у експериментальних тварин і призводять до зниження в лейкозних клітинах експресії ОДК, рівня поліамінів, підвищення загального рівня метилювання ядерної ДНК та зниження експресії білкових продуктів генів *(c-myc, bcl-xl, inos)*, залучених в ріст і проліферацію пухлин. Отримані дані свідчать про існування взаємозв'язку між експресією досліджених генів та обміном поліамінів. Одержані дані будуть служити підгрунтям для розробки нових, більш ефективних схем лікування онкологічних хворих.

Дослідження проведені при підтримці УНТЦ, грант №4894.

EFFECT OF SYNTHETIC AND NATURAL INHIBITORS/MODULATORS OF POLYAMINE METABOLISM ON PROGRESSING OF L1210 LYMPHATIC LEUKEMIA IN MICE AND TOTAL DNA METHYLATION, POLYAMINES' METABOLISM AND EXPRESSION OF PROTEIN PRODUCTS OF GENES INVOLVED IN CELL PROLIFERATION AND APOPTOSIS

Zaletok S.P., Shlyakhovenko V.O., Orlovsky O.A., Gogol' S.V., Samoylenko O.A., Klenov O.O., Yanish Yu.V., Verbynenko A.V., Milinevska V.O., Karnaushenko O.V., Malashko L.I.

R.E.Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine, Kyiv
e-mail: sophiazaletok@mail.ru

Aim: to study the effect of synthetic and natural inhibitors/modulators of polyamines' (PA) metabolism on disposition of DNA methylation and on expression of gene protein products involved in proliferation and apoptosis.

Methods: DNA electrophoresis, gel-electrophoresis of proteins; Western-blotting; surface plasmone resonance (SPR); liquid chromatography; fluorometry; biochemical and immunohistochemical methods; methods of experimental oncology; statistical methods.

Results. Effect of α-difluoromethylornithine (α-DFMO), polyhexamethylenguanidine (PMG), green tea polyphenols **(**GTPPh) and other polyamine metabolism modulators ($Cu(Orn)_2$ complex and suspension of Fe_3O_4 nanoparticles) alone or in combinations on intraperitoneal L1210 lymphatic leukemia cells' proliferation in mice, on total level of nuclear DNA methylation in leukemia cells, on intracellular content of PA and their acetylated derivatives and on expression of ODC protein and protein products of *p53, c-myc* and *bcl-XL* genes was studied. α-DFMO (800 mg/kg of body mass intraperitoneally or as 2% solution in drinking water) and GTPPh (0.1% solution in drinking water), both alone and together, did not affect ascites volume but essentially (1.85 – 2.3-times) diminished concentration (i.e., amount) of leukemia cells in ascites and enhanced average lifespan of animals. Other agents have been tested also retarded leukemia cells' proliferation: PMG for 63%, $Cu(Orn)_2$-complex – for 40%, Fe_3O_4 nanoparticles – for 30.2%.

Block of PA biosynthesis caused by α-DFMO or other agents have been tested led to significant increase of total nuclear DNA methylation in leukemia cells.

GTPPh, PMG and α-DFMO were shown to enhance p53 protein expression and diminish expression of ODC protein (the key enzyme of PA biosynthesis) bcl-xl and c-myc proteins in leukemia cells. α-DFMO and GTPPh in combination caused decrease expression of bcl-xl, iNOS and c-myc proteins.

α-DFMO been administered to the animals as 2% solution in drinking water, versus α-DFMO 800 mg/kg intraperitoneally, not only more significantly decreased putrescine level but also sharply diminished spermidine content in leukemia cells. PMG administration led to 2.3-times decreased putrescine content and 17% decreased spermidine content. Both $Cu(Orn)_2$ and (PMG+GTPPh) administration resulted in enhanced level of acetylated spermidine (Ac-spd) and decreased level of putrescine, versus control.

Conclusion*.* Synthetic and natural inhibitors/modulators of PA metabolism (α-DFMO, PMG, $Cu(Orn)_2$, GTPPh) had significantly retard the progressing of L1210 lymphatic leukemia in experimental animals and diminished expression of ODC and other proteins involved in tumor growth and proliferation (products of *c-myc, bcl-xl* and *inos* genes), so as polyamines' content, enhanced the total level of nuclear DNA methylation in leukemia cells. These data show interrelations between expression of the genes have been studied and polyamines' metabolism would be a basis for new, more effective methods of cancer treatment.

Work is support by STCU, grant № 4894.

ОСОБЕННОСТИ ЭЭГ ПОКОЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИЗМЕНЕНИИ АКТИВНОСТИ DEFAUNT NETWORK НА ФОНЕ НЕРЕЛЕВАНТНОЙ АКТИВАЦИИ ОБОНЯТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ЭФИРНЫМИ МАСЛАМИ

Зима И.Г., Крыжановский С.А., Чернинский А.А., Пискорская Н.Г. ,Филимонова Н.Б.

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

В последнее время внимание ученых все больше привлекает изучение нейрофизиологических механизмов функционирования так называемых «дефолтных нейросетей (ДНС) («целе-негативные сети») головного мозга – комплекса мозговых образований, которые активизируются в спокойном бодрствующем состоянии при отсутствии внешней релевантной сенсорной стимуляции (активации), т.е. состоянии, которое обычно называется отдыхом. Во время активного бодрствования и, особенно, при решении какой-либо внешне обусловленной задачи или просто осуществлении какой-либо деятельности, «дефолтные сети» переходят в неактивное состояние, а активируются т.н. «целе-положительные сети», обеспечивающие целенаправленное поведение (активное бодрствование). Активность ДНС обычно связывают с процессами сознания, внутренней психической активностью, речью, фантазиями, мечтаниями, медитацией и т.д. Детальное изучение функционирования ДСН связывают с возможностью лечения-коррекции таких заболеваний как слабоумие, аутизм, депрессии при шизофрении и болезни Альцгеймера и д.р. Само понятие «дефолтные сети» было сформировано учеными при ПЭТ- и фМРТ-сканировании головного мозга. К сожалению, в настоящее время исследования электрофизиологических коррелятов ДСН являются очень фрагментарными. Поэтому цель данного исследования состояла в исследовании нейродинамики ЭЭГ-параметров человека в состоянии спокойного бодрствования во время достаточно длительного покоя (до 10 мин.) с закрытыми глазами в комфортной обстановке ароматизированного растительными эфирными маслами воздуха. Исследование проведено на добровольцах студентах обоих полов 19-24 лет без жалоб на состояние здоровья. Воздух ароматизировали растительными эфирными маслами обычно применяемыми в ароматерапевтической практике. ЭЭГ регистрировали по стандартной схеме; анализировались топокарты изменений спектральной мощности и средних уровней когерентности (СРК). Значимость изменений регистрируемых параметров оценивали с помощью непараметрического критерия знаковых ранговых сумм Вилкоксона. Во время эксперимента испытуемый находился в условиях определенной сенсорной ограниченности - в темном помещении с закрытыми глазами, в тишине, в удобном положении полулежа. Начало одорации воздуха (1-2мин.) в данном случае не анализировались в связи с развитием у обследуемых ориентировочной реакции на запах. В связи с тем, что запахи используемых одорантов не были обусловлены, т.е. были нерелевантными для наших испытуемых и их наличие в окружающем воздухе не требовало какой-либо конкретной реакции или действия, мы предположили возможность активации у них в это время «дефолтных нейросетей», тем более что морфологические структуры последних (префронтальная, темпоральная, цингулярная и некоторые зоны париетальной коры (Buckner R. et al., 2008)) активно взаимодействуют с «обонятельными образованиями» головного мозга человека.

Результаты исследования показали, что нейродинмика ЭЭГ испытуемых в условиях нашего эксперимента существенно отличалось от таковой в контрольных опытах. Наиболее выраженные отличия состояли в существенном повышении значений мощност-ных показателей в θ1,2-, β1,2- и α3-поддиапазонах, на фоне генерализованного снижения мощности α2- и частичного (лобные и правовисочная область) α1- поддиапазонах. Такие изменения ЭЭГ дают возможность говорить о достаточно высоком уровне ментальной активности несмотря на внешнюю бездеятельность испытуемых. Это подтверждают и полученные изменения СРК – состояние покоя на фоне ароматизации воздуха сопровождалось повышением межфполушарных взаимодействий по всей коре в α3- и организацией фокусов взаимосвязей в обоих темпоральных областях в α2- поддиапзонах. Кроме того, сформировался четкий фокус интеграци задних областей мозга с центром в правой окципитальной зоне (β1-). При этом наблюдалось существенное ослабление взаимосвязей в передних областях в β1,2- и когерентных объединений фронтальных областей с окципитальными и темпоральными зонами в α2-диапазоне. Все указанные изменения дают возможность сделать вывод о том, что в наших условиях эксперимента (одорация воздуха помещения растительными эфирными маслами) у испытуемых состояние покоя сопровождалось активацией внутренних психических процессов, т.е. активацией ДНС. Изменения в α-диапазоне в свою очередь указывает на тот факт, что применение одорации воздуха приводит к повышению комфортности условий и оптимизации когнитивных функций, что предполагает как улучшение самочувствия так и повышение успешности (эффективности) выполнения последующих заданий (Hanslmayr et.al.,2005).

Литература

1. *Buckner R.L., Andrews-Hanna J.R., Schacter D.L.* The brain's default network: anatomy, function, and relevance to disease // *Ann N Y Acad Sci* 2008.- V1124, N1.- P. 1–38
2. *Hanslmayr S., Sauseng P., Doppelmayr M., Schabus M., Klimesch W.* Increasing individual upper alpha power by neurofeedback improves cognitive performance in human subjects // Appl. Psycophys. A. biofeedback 2005.- V.30,N1.- P.1-10

EEG REST BRAIN FEATURES AT A CHANGE ACTIVITY OF MAN ` S DEFAULT NETWORK A BACKGROUND UNRELEVANT ACTIVATING OF THE OLFACTORY SYSTEM BY ESSENTIAL OILS

Zima I.G., Krizhanovskiy S.A., Cherninskiy A.A., Piskorskaya N.G., Filimonova N.B.

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

Last time, the attention of scientists all anymore attracts the study neurophysiological mechanisms of functioning of the so-called «default network» (DNS) (task-negative network) of the brain – complex of cerebral structures which activate in the quiet waking state in default of external relevant sensory stimulation (activating), the state which is usually named the state of rest. During an active waking state and, especially, at the decision of some outwardly conditioned task or simply realization of some activity, «default network» pass to the dormant state, and activated so-called «task-positive network», providing a purposeful behaviour. Activity of DNS is usually bound to the processes of consciousness, internal psychical activity, internal speech, fantasies, dreamings, meditation et cetera The detailed study of functioning of DSN is bound to possibility by the treatments-corrections of such diseases as mindedness, autism, depressions at schizophrenia and Alzheimer's disease and others. A concept «default network» was formed scientific at PET- and fMRT-scan-out of the brain. Unfortunately, contemporary investigations the DNS electro-physiological correlates are very fragmentary. Therefore the purpose of this research was to investigate the EEG-parameter`s neurodynamic of man in a resting state (up to 10 min.) with closed eyes and in a comfortable conditions aromatized essential oils air. Research was accomplished on volunteers students of both sex of 19-24 years without complaints about theirs state of health. Air was aromatized by plant essential oils, which usually applied in aromatherapeutic practice. EEG registered on a standard conditions, the topomaps of the spectral power changes and middle levels of coherence (Coh) were analysed. Meaningfulnesses of the registered parameters changes of were estimated by the Vilkokson`s non-parametric criterion of sign grade sums. During an experiment an examinee was in the conditions of certain sensory narrow-mindedness - in a dark apartment with closed eyes, in a silence, in comfortable position. The beginning of air odorathion (1-2min.) not analysed because of the development at inspected of reference reaction on a odor. In connection with that the flavoures of in-use odorants were not conditioned, i.e. they were unrelevant for our examinees and their presence in surrounding air did not require some concrete behavioural reaction or action, we supposed possibility of activating at this time «default networks», all the more that morphological structures «default networks» (prefrontal, temporal, cingular and some areas of parietal lobe (Buckner R. et al., 2008)) actively co-operate with «olfactory formations» in man`s brain.

Investigation results achieved that neurodinamike of examinees EEG in the conditions of our experiment substantially differed from such in control experiments. The most expressed differences consisted of substantial increase of values of spectral power indexes in θ1,2-, β1,2- and α3- sub-bands, on a background the generalizing decline of power of α2- and partial (frontal and right temporal areas) of α1- sub-bands. Such changes EEG enable to talk about the high level of mental activity in spite of external inactivity of examinees. This is confirmed by the got changes of Coh – a mind resting state upon a background aromatization of air was accompanied the increase of cerebral hemispheres co-operations on all brain zones in αa3- and organization of intercommunication`s focuse in both temporal areas in α2-sub-band. In addition, focus of integraci of back areas of brain was formed with a center in the right occipital area (β1-). Thus there was the substantial weakening of interconnections in front areas in β1,2- and coherent associations of frontal areas with okcipital and temporal areas in α2-sub-bands.

All pointed changes enable to draw conclude that in our terms of experiment (air odoration of apartment plant`s essential oils) at an examinee the resting state a examinee was accompanied activating of internal psychical processes, i.e. activating of DNS. Changes in the α-band in same queue specifies on circumstance that application of odoration of air leads to the increase of comfort of terms and optimization of cognitive functions, that supposes as an improvement of feel is an increase of success (to efficiency) of implementation of subsequent tasks (Hanslmayr et.al.,2005).

References:

1. *Buckner R.L., Andrews-Hanna J.R., Schacter D.L.* The brain's default network: anatomy, function, and relevance to disease // *Ann N Y Acad Sci* 2008.- V1124, N1.- P. 1–38
2. *Hanslmayr S., Sauseng P., Doppelmayr M., Schabus M.,* Klimesch W. Increasing individual upper alpha power by neurofeedback improves cognitive performance in human subjects // Appl. Psycophys. A. biofeedback 2005.- V.30,N1.- P.1-10

МИАСТЕНИЯ ГРАВИС И ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫЕ ИНГИБИТОРЫ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

[1,2]Зобов В.В., [1,3]Петров К.А., [1,2]Никиташина А.Д., [4]Рогожин А.А., [3]Никольский Е.Е., [1]Резник В.С.

[1]Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия
[2]Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия
[3]Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия
[4]Казанская государственная медицинская академия, Казань, Россия
e-mail: zobov@iopc.ru

Ранее было показано, что для синапс-специфического ингибирования ацетилхолинэстеразы (АХЭ; К.Ф.3.1.1.7) необходимо наличие в структуре четвертично-аммониевых соединений 2,4-диоксо-фрагмента (урацилового или иного), удаленного на расстояние пяти метиленовых групп от аммониевых групп [1, 2]. Как известно, основной проблемой, ограничивающей использование всех традиционных ингибиторов холинэстераз (ХЭ), является отсутствие избирательности их действия на АХЭ из разных органов и тканей. Вследствие этого, одновременно с воздействием на орган, функционирование которого требует фармкоррекции, происходит инактивация ХЭ и в других органах, коррекции не требующих, что приводит к развитию множества токсических эффектов, связанных с гиперактивацией гладкой мускулатуры, ингибированием бутирилхолинэстеразы крови, фатальным нарушениями работы дыхания, сердца и мозга. Этих недостатков могли бы быть лишены селективные ингибиторы АХЭ, способные избирательно влиять на работу целевых биомишеней (локомоторных мышц или мозга). Однако до настоящего времени соединения с подобными свойствами описаны не были. Предпосылки возможности создания подобных соединений появились при исследовании нами более 300 четвертично-аммониевых производных урацила и ксантина, проявляющих необычно высокую для антихолинэстеразных веществ терапевтическую безопасность $ЛД_{50}/ЭД_{50}$≥50-100 в тесте «бег на третбане» [1]. Было показано, что соотношение констант ингибирования АХЭ/бутирилхолинэстераза для ряда соединений достигает 100 000 крат [2], а константа ингибирования очищенной АХЭ мозга на 4 порядка выше, чем для АХЭ мышц [3, 4]. С помощью мутантных животных без G_4 изоформы АХЭ показано, что устойчивость к ингибированию коррелирует с присутствием именно данной изоформы АХЭ в мозге и в диафрагме. АХЭ сердца и гладкой мускулатуры также устойчива к ингибированию соединениями [3, 4]. Все это позволило начать проверку эффективности соединений для преодоления последствий экспериментальной модели миастении гравис (Baggi et al., 2003) с использованием электрофизиологических и биохимических методов. Полученные данные показывают, что наилучшие соединения могут быть рекомендованы для клинических испытаний как средства для лечения миастении гравис.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №09-04-12047-офи_м, гранта Президента РФ НШ-64631.2010.7, программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» - «Мозг: фундаментальные и прикладные проблемы», программ фундаментальных исследований РАН ОХНМ-5 и Президиума РАН № 3.

Литература:

1. *В.В. Зобов, К.А. Петров, А.А. Аслямова, Л.А. Березинский, В.Д. Акамсин, И.В. Галяметдинова, В.С. Резник.* // Избирательная блокада локомоторных мышц урацилсодержащими тетраалкиламмониевыми ингибиторами ацетилхолинэстеразы - Доклады Российской академии наук, 2005, т. 401, N 1, -с. 120-123.
2. *K.A. Anikienko, E.A. Bychikhin, V.S. Reznik, V.D. Akamsin, I.V. Galyametdinova.* // Compounds with the dioxopyrimidine cycle inhibit cholinesterases from different groups of animals - Chem. Biol. Interact., 2008, V. 175, N 1-3, p. 286-292.
3. *D.V. Abramochkin, K.A. Petrov, V.V. Zobov, L.O. Iagodina, E.E. Nikol'skii, L.V. Rozenshtraukh.* // Mechanisms of cardiac muscle insensitivity to a novel acetylcholinesterase inhibitor C-547 - J. Cardiovasc. Pharmacol., 2009, V. 53, N 2, p. 162-166.
4. *K.A. Petrov, L.O. Yagodina, G.R. Valeeva, N.I. Lannik, A.D. Nikitashina, A.A. Rizvanov, V.V. Zobov, E.A. Bukharaeva, V.S. Reznik, E.E. Nikolsky, F. Vyskočil.* // Different sensitivities of rat skeletal muscles and brain to novel anti-cholinesterase agents, alkylammonium derivatives of 6-methyluracil (ADEMS) - Br. J. Pharmacol., 2011, Jan 14, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01211.x. [Epub ahead of print].

MYASTHENIA GRAVIS AND TISSUE-SPECIFIC ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORS

[1,2]Zobov V.V., [1,3]Petrov K.A., [1,2]Nikitashina A.D., [4]Rogozhin A.A., [3]Nikolsky E.E., [1]Reznik V.S.

[1]A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan Scientific Centre of RAS, Kazan, Russia
[2]Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia
[3]Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of RAS, Kazan, Russia
[4]Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia
e-mail: zobov@iopc.ru

Earlier it has been shown that for sinapse-specific inhibition of acetylcholinesterase (AChE) presence in structure of quarter-ammonium compounds 2,4-dioxo-fragment (uracil or other) remoted by distance of five methylene groups from ammonium groups [1, 2] is necessary. Earlier we have shown a basic possibility of development in a class of quarter-ammonium inhibitors of cholinesterase (ChE), operating by mechanism of synapse-specific inhibition of AChE, with minimum striking effects on the vital functions. As known, the basic problem limiting use of all traditional inhibitors of ChE is absence of selectivity of their action on AChE from different organs and tissues. Therefore, simultaneously with influence on the organ, which functioning demands treatment, there is an inactivation of ChE in other, healthy organs, that leads to set of the toxic effects related with hyperactivation of smooth muscles, inhibition of butyrylcholinesterase of the blood, fatal infringements of breath, heart and brain. These defects could be deprived the selective inhibitors of AChE capable to selectively influence targets (locomotory muscles or brain). However till now compounds with such properties haven't been described. Possibility of creation of suchlike compounds have appeared by our research of more than 300 quarter-ammonium derivatives of uracil and xanthine, showing unusually high for anticholinesterase substances therapeutic safety LD_{50}/ED_{50}≥50-100 in the test «run on treadmill» [1]. It has been shown that the parity of constants of inhibition AChE/butyrylcholinesterase for a number of compounds is reached to 100 000 times, and an inhibition constant of purified AChE of brain is by 4 order above, than that for AChE of muscles [3, 4]. By means of mutant animals without G4 isoforms of AChE was shown that stability to inhibition correlates with presence of this isoform of AChE in brain and diaphragm. AChE of heart and smooth muscles is also steady against inhibiting compounds [3, 4]. All of this allowed to begin checking of efficiency of compounds to overcome consequences of experimental model of a myasthenia Gravis (Baggi et al., 2003) by means of electrophysiological and biochemical methods. Data obtained shows that the best compounds can be recommended for clinical tests as means for treatment of myasthenia Gravis and myasthenia-like conditions.

The research is supported with grant RFBR No. 09-04-12047-ofi_m, grant of Russian Federation President NSh-64631.2010.7, program of fundamental research of Presidium RAS "Fundamental science for medicine" – "Brain: fundamental and applied problems", programs No 5 of Branch of General and Technical Chemistry and No 3 of Presidium RAS.

References

1. *V.V. Zobov, K.A. Petrov, A.A. Asliamova, L.A. Berezinskii, V.D. Akamsin, I.V. Galiametdinova, V.S. Reznik.* // Selective blockade of locomotor muscles by uracil-containing tetraalkylammonium acetylcholinesterase inhibitors - Dokl Biol Sci., 2005, V. 401, N 1-3, p. 120-123.
2. *K.A. Anikienko, E.A. Bychikhin, V.S. Reznik, V.D. Akamsin, I.V. Galyametdinova.* // Compounds with the dioxopyrimidine cycle inhibit cholinesterases from different groups of animals - Chem. Biol. Interact., 2008, V. 175, N 1-3, p. 286-292.
3. *D.V. Abramochkin, K.A. Petrov, V.V. Zobov, L.O. Iagodina, E.E. Nikol'skii, L.V. Rozenshtraukh*. // Mechanisms of cardiac muscle insensitivity to a novel acetylcholinesterase inhibitor C-547 - J. Cardiovasc. Pharmacol., 2009, V. 53, N 2, p. 162-166.
4. *K.A. Petrov, L.O. Yagodina, G.R. Valeeva, N.I. Lannik, A.D. Nikitashina, A.A. Rizvanov, V.V. Zobov, E.A. Bukharaeva, V.S. Reznik, E.E. Nikolsky, F. Vyskočil*. // Different sensitivities of rat skeletal muscles and brain to novel anti-cholinesterase agents, alkylammonium derivatives of 6-methyluracil (ADEMS) - Br. J. Pharmacol., 2011, Jan 14, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01211.x. [Epub ahead of print].

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ВВЕДЕНИИ ПРОТЕИНА SP-2

[1]Ибрагимов Ф.А., [1]Береснева Ю.В., [2]Абдувалиев А,А., [2]Гильдиева М.С.

[1]-Институт биоорганической химии АН РУз, г. Ташкент, Республика Узбекистан.
e-mail: afazil55@rambler.ru
[2] Республиканский онкологический научный центр, г. Ташкент, Республика Узбекистан.

Изменение числа и структуры хромосом в соматических клетках и зародышевых клетках могут возникать спонтанно или после воздействия физическими и химическими агентами[1, 2].

Был проведен цитогенетический анализ клеток костного мозга мышей линии BALB/c при воздействии протеина sp-2, обладающего противоопухолевой активностью, в дозе 150 мг/кг (мыши интактные, без опухоли). Мутагенную активность клеток красного костного мозга определяли прямым методом часового культивирования для хромосомного анализа по Форду [3]. При анализе метафазных пластинок было установлено, что протеин sp-2 в исследованной дозе не вызвал увеличения аберраций хромосом (у контрольных животных число аберраций хромосом составило 1,6%±0,2, в опытной группе число аберраций хромосом составило 1,8±0,1) (табл. 1).

Таблица 1

Доза воздействия протеина sp-2	Количество исследованных метафаз	Аберрантные метафазы, %	Аберрации хромосом, %	Типы аберраций, %	
				Делеции, %	Фрагменты, %
Интактные мыши BALB/c, n=5	500	1,4±0,2	1,6±0,2	28,6±3,3	71,4±5,6
Воздействие протеином sp-2 на интактных мышей BALB/c, n=5	500	1,8±0,2	1,8±0,1	44,4±3,5	55,6±4,3

Затем был проведен цитогенетический анализ клеток костного мозга мышей линии C57Bl/b при воздействии протеина sp-2 в дозе 150 мг/кг (мыши с имплантированной опухолью меланома B-16) (табл. 2).

Таблица 2

Доза воздействия протеина sp-2	Количество исследованных метафаз	Аберрантные метафазы, %	Аберрации хромосом, %	Типы аберраций, %	
				Делеции, %	Фрагменты, %
Меланома B-16 150 мг/кг	250	11,2±0,21	11,2±0,23	42,9±3,3	57,1±3,2
Контроль	250	19,6±0,3	21,2±0,2	37,7±2,2	62,3±3,5

Воздействие протеином sp-2 привело к уменьшению нарушений в хромосомном аппарате раковых клеток у контрольных животных число аберраций хромосом, составило 21,2%±0,2, в опытной группе число аберраций хромосом составило 11,2%±0,23. Исследовали, также «аберрантные метафазы» - это метафазы, в которых были обнаружены нарушения в хромосомном аппарате клеток, при этом учитывались не только поломки хромосом, но и структурные изменения (изменения количества хромосом, полиплоидия и т.д.). У контрольных животных число «аберрантных метафаз», составило 19,6±0,3%, в опытной группе -11,2±0,21%.

Данные эксперименты достоверно подтверждают лечебный эффект влияния протеина sp-2 на раковые клетки, что приводит к снижению хромосомной нестабильности, а значит, и к снижению резистентности раковых клеток к терапии.

Литература:

1. *Hoh L., Gravells P., Canovas D., Ul-Hassan A., Rennie I.G., Bryant H., Sisley K.* Atypically low spontaneous sister chromatid exchange formation in uveal melanoma. // Genes Chromosomes Cancer. 2010. V.123. P.121-123.
2. *Bendix L., Kølvraa S.* The role of telomeres in aging-related disease. // Ugeskr. Laeger. 2010. V.172(40). P.2752-2755; Toyota M., Suzuki H. Epigenetic drivers of genetic alterations, // Adv. Genet. 2010. V.70. P.309-323.
3. Оценка мутагенности новых лекарственных средств. Методические рекомендации.- Москва, 1994. – 20 с.

CYTOGENETIC ANALYSIS OF BONE MARROW CELLS IN EXPERIMENTAL ANIMALS AFTER INTRODUCTION OF SP-2 PROTEIN

[1] Ibragimov F.A., [1] Beresneva Yu.V., [2] Abduvaliev A.A., [2] Gildieva M.S.

[1] Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
e-mail: afazil55@rambler.ru
[2] National Cancer Research Center, Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan.

Changes in the number and structure of chromosomes in somatic cells and germ cells may occur spontaneously or after exposure to chemical and physical agents [1, 2].

We conducted a cytogenetic analysis of bone marrow cells of BALB/c line mice after exposure to sp-2 protein possessing antitumor activity, in a dose of 150 mg/kg (intact mice, without tumor). Mutagenic activity of cells in red bone marrow was determined by the direct method of hourly cultivation for chromosome analysis according to Ford [3]. Analysis of metaphase plates has shown that sp-2 protein in investigated doze did not cause chromosome aberration (amount of chromosome aberration at control group reached 1,6%±0,2, in experimental group it accounted to 1,8%±0,1) (table 1).

Table 1

Sp-2 protein influence doze	Quantity of studied metaphases	Aberrant metaphases (%)	Chromosome aberrations	Aberration types, %	
				deletions, %	fragments, %
Intact mice BALB/c, n=5	500	1,4±0,2	1,6±0,2	28,6±3,3	71,4±5,6
Influence of sp-2 on intact mice BALB/c, n=5	500	1,8±0,2	1,8±0,1	44,4±3,5	55,6±4,3

We carried out cytogenetic analysis of marrow cells of C57Bl/b line mice with transplanted Melanoma B-16 tumor at influence of sp-2 protein (150mg/kg) (table 2).

Table 2

Sp-2 protein influence doze	Quantity of studied metaphases	Aberrant metaphases (%)	Chromosome aberrations	Aberration types, %	
				deletions, %	fragments, %
melanoma B-16 150 mg/kg, n=5	250	11,2±0,21	11,2±0,23	42,9±3,3	57,1±3,2
Control, n=5	250	19,6±0,3	21,2±0,2	37,7±2,2	62,3±3,5

Treatment with sp-2 protein resulted in reduction of abnormalities in chromosomal system of cancer cells. Amount of chromosome aberration at control group reached 21,2%±0,2, whereas in experimental group it accounted to 11,2%±0,23. Also we studied “aberrant metaphases”. These are the metaphases, where abnormalities in chromosomal system were observed. As abnormalities we considered not only breakage of chromosomes, but also structural changes (in quantity of chromosomes, polyploidy, etc.). Amount of aberrant metaphases at control group reached 19,6±0,3%, %, whereas at experimental group this indicator amounted to 11,2±0,21%.

These experiments clearly prove the medical effect of influence of sp-2 protein on cancer cells, what results in reduction of chromosomal instability, and therefore reduction of resistance of cancer cells to therapy.

References:

1. Hoh L., Gravells P., Canovas D., Ul-Hassan A., Rennie I.G., Bryant H., Sisley K. Atypically low spontaneous sister chromatid exchange formation in uveal melanoma. // Genes Chromosomes Cancer. 2010. V.123. P.121-123.
2. Bendix L., Kølvraa S. The role of telomeres in aging-related disease. // Ugeskr. Laeger. 2010. V.172(40). P.2752-2755; Toyota M., Suzuki H. Epigenetic drivers of genetic alterations, // Adv. Genet. 2010. V.70. P.309-323.
3. Evaluation of mutagenicity of new drugs. Methodical recommendations.- Moscow, 1994. - p20.

ВЛИЯНИЕ ЛИПОВЕРТИНА НА ВНЕШНИЙ ПУТЬ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ НА МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОЙ ВЕНОЗНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ У КРЫС

Иванов И.С., Сидехменова А.В., Плотников М.Б.

Научно-исследовательский институт фармакологии СО РАМН, Томск, Россия
e-mail: mbp2001@mail.ru

По данным различных авторов от 20% трудоспособного населения экономически развитых стран страдает хронической венозной недостаточностью нижних конечностей (ХВННК). Течение данного заболевания, в особенности тяжелых форм, сопровождается нарушениями в системе как тромбоцитарно-сосудистого, так и коагуляционного гемостаза [1, 2, 3].

Целью исследования является оценка способности липовертина – новой антиоксидантной композиции дигидрокверцетина и липоевой кислоты нормализовать состояние коагуляционного гемостаза у крыс на модели ХВННК.

Эксперименты выполнены на 20 крысах-самцах Вистар массой 300–350 г. ХВННК воспроизводили путем ограничения кровотока в полой вене. У ложнооперированных животных полностью повторяли оперативное вмешательство, исключая этап окклюзии сосуда. Животным опытной группы (n=7) ежедневно внутрижелудочно вводили композицию дигидрокверцетина и липоевой кислоты (100 мг/кг) в виде взвеси в 1% крахмальной слизи; контрольной (n=6) и ложнооперированной группы (n=7) 1% крахмальную слизь в эквиобъемном количестве. Первое введение осуществляли через сутки после оперативного вмешательства, последнее – за час до забора крови. На 14-е сутки у животных оценивали активированное парциальное тромбопластиновое (АПТВ, с) и протромбиновое время (ПВ, с), а также содержание фибриногена (ФГ, г/л). Данные представлены в виде M±m, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего значения. Для оценки достоверности межгрупповых различий использовали непараметрический критерий Mann-Whitney U test.

На 14-е сутки у животных контрольной группы выявлено нарушение внешнего пути свертывания, отразившееся в значимом укорочении ПВ на 3,2 с по сравнению с ложнооперированными животными. Изменений показателей АПТВ и ФГ не выявлено. Липовертин при курсовом введении нормализовал ПВ до уровня значений, наблюдаемых в группе ложнооперированных животных.

Влияние липовертина (100 мг/кг) при курсовом введении в течение 14 суток на показатели гемостаза

Группа животных	АПТВ, с	ПВ, с	ФГ, г/л
Ложнооперированные	11,8±0,7	22,2±0,6	3,2±0,1
Контроль	11,0±0,6	19,0±1,3*	3,4±0,2
Липовертин	11,2±0,3	22,9±0,8^{+}	3,1±0,2

Примечание: * – p<0,.05 по сравнению с ложнооперированными животными; $^{+}$ – p<0,.05 по сравнению с контролем.

Таким образом, липовертин предотвращает развитие гиперкоагуляционного синдрома по внешнему пути свертывания в условиях модели ХВННК.

Литература:

1. *Blomgren L., Johansson G., Siegbahn A., Bergqvist D.* Coagulation and fibrinolysis in chronic venous insufficiency / Vasa. – 2001. – Vol. 30, № 3. – P. 184–187.
2. *Gajraj H., Browse N.L.,* Fibrinolytic activity of the arms and legs of patients with lower limb venous disease / Br. J. Surg. – 1991. – Vol. 78, № 7. – P. 853–856.
3. *Lee A.J., Lowe G.D., Rumley A. et al.* Haemostatic factors and risk of varicose veins and chronic venous insufficiency: Edinburgh Vein Study / Blood Coagul., Fibrinolysis. – 2000. – Vol. 11, № 8. – P. 775–781.

INFLUENCE OF LIPOVERTIN ON THE EXTRINSIC PATHWAY OF BLOOD COAGULATION ON MODEL CHRONIC VENOUS INSUFFICIENCY LOWER LIMB IN RATS

Ivanov I.S., Sidekhmenova A.V., Plotnikov M.B.

Scientific-research Institute of Pharmacology, Siberia Department, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, Russia
e-mail: mbp2001@mail.ru

Some authors described that about 20% employable population have chronic venous insufficiency of lower limbs (CVI) in the industrialized countries. Clinical run of this disease is accompanied by disturbances in system both platelet-vascular, and a coagulative hemostasis [1, 2, 3].

Aim of this study was to estimate the ability of lipovertin (new antioxidative composition of dihydroquercertin and lipoic acid) to normalize a state of a coagulative hemostasis in rat's model of CVI.

Experiments were carried out on 20 male Wistar rats with mass of 300–350 g. CVI was modeled by partial blood flow occlusion of vena cava. Sharm-operated animals were subjected operating procedures without of vena cava ligation. Animals of experiment group (n=7) received the composition of dihydroquercertin and lipoic acid in dose of 100 mg/kg *p.o.* in 1% of starched slime daily; animals of control and sharm-operated group received the same volume of 1% starched slime. The first dose of lipovertin was administrated on the next day after an operation, the last dose – an hour before blood collection. Activated partial thromboplastin time (APTT, s), prothrombin time (PT, s) fibrinogen concentration (Fg, g/l) were determined after 14 days partial ligation of vena cava.

Data were expressed as means ± S.E.M. Comparisons between groups were performed using a nonparametric analysis followed by Mann-Whitney U test.

After two weeks in animals of control group the disturbance of extrinsic pathway of blood coagulation was demonstrated. It follows from the significantly decreased PT on 3,2 s in comparison with sharm-operated animals. Changes of APTT and Fg were not detected. Course administration of lipovertin normalized PT to level of the value observed in sharm-operated animals.

Effect of lipovertin (100 mg/kg, *p.o.* by course administration during 14 days) on hemostasis parameters

Animal group	APTT, s	PT, s	Fb, g/l
Sharm-operated	11,8±0,7	22,2±0,6	3,2±0,1
Control	11,0±0,6	19,0±1,3*	3,4±0,2
Lipovertin	11,2±0,3	22,9±0,8^{+}	3,1±0,2

* – p<0,05 in comparison with sharm-operated animals; $^{+}$ – p<0,05 in comparison with the control.

Thus, lipovertin prevents development of a hypercoagulative syndrome through the extrinsic pathway of blood coagulation in rats with model of CVI.

References:

1. *Blomgren L., Johansson G., Siegbahn A., Bergqvist D.* Coagulation and fibrinolysis in chronic venous insufficiency / Vasa. – 2001. – Vol. 30, № 3. – P. 184–187.
2. *Gajraj H., Browse N.L.,* Fibrinolytic activity of the arms and legs of patients with lower limb venous disease / Br. J. Surg. – 1991. – Vol. 78, № 7. – P. 853–856.
3. *Lee A.J., Lowe G.D., Rumley A. et al.* Haemostatic factors and risk of varicose veins and chronic venous insufficiency: Edinburgh Vein Study / Blood Coagul., Fibrinolysis. – 2000. – Vol. 11, № 8. – P. 775–781.

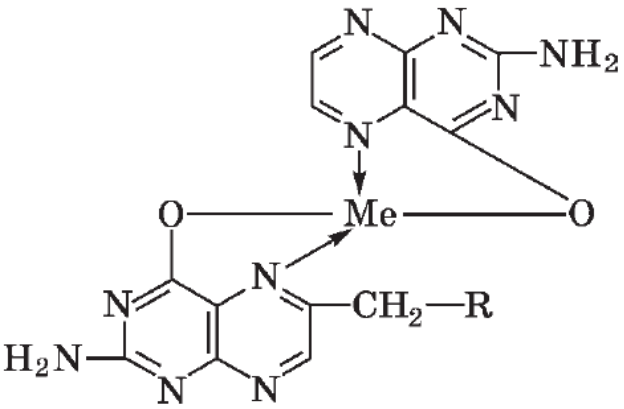
ГЕПАТОЗАХИСНА ФУНКЦІЯ ФОЛІЄВОЇ КИСЛОТИ ЗА УМОВ ІНТОКСИКАЦІЇ КАДМІЄМ

Калінін І.В.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Киев, Україна
e-mail: ikalin@rambler.ru

Сучасне загострення екологічної ситуації є однією з найважливіших проблем, що обумовлює необхідність вивчення механізмів адаптації організмів до важких металів, як найнебезпечніших забруднювачів. Високий рівень їх надходження до організму спричиняє істотні порушення обміну речовин, що в кінцевому результаті, впливає на стан здоров'я людини. Розкриття механізмів формування адаптаційних реакцій неможливе без вивчення антиоксидантних систем, які приймають активну участь в біохімічних процесах захисту клітини при стресовому впливі різноманітних ксенобіотиків.

Фолієва кислота виконує важливу роль в реакціях синтезу нуклеїнових кислот, білків, обміні фосфоліпідів, підвищує каталітичну активність мікросомальних монооксигеназ, позитивно впливає на функціональний стан печінки, стимулює жовчовиділення, зменшує жирову інфільтрацію печінки, викликану дефіцитом холіну в їжі. Наявність у птериновій частині молекули фолієвої кислоти гідроксильних груп і третинних атомів нітрогену дозволяє зв'язувати солі важких металів (схема нижче).



Метою роботи було оцінити здатність фолієвіої кислоти протидіяти токсичним ефектам кадмію сульфату на печінку щурів.

Дослідження проводили на білих нелінійних щурах-самцях одного віку, масою 180-200 г. Було утворено дві групи тварин: перша – інтактні (контроль), друга – тваринам перорально вводили розчин кадмію сульфату в дозі 1/30 від $ЛД_{50}$ – 14 діб, а потім впродовж 10 днів інтоксиковані тварини отримували фолієву кислоту в дозі 0,1 мг/кг. Після закінчення експерименту щурів декапітували під ефірним наркозом та відбирали тканини печінки для подальших досліджень. Робота проводилась відповідно до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях.

Встановлено, що інтоксикація кадмію сульфатом призвела до зниження вмісту відновленого глутатіону (GSH) у 2,5 рази, зниженню активності супероксиддисмутази (СОД) і каталази (КАТ) у 2 рази відносно контрольної групи в печінці щурів. Разом з тим, застосування фолієвої кислоти, після отруєння кадмієм, сприяло підвищенню активності СОД на 32% і активності КАТ на 28% та збільшенню вмісту GSH на 47% у порівнянні з інтоксикованими тваринами.

Таким чином, отримані дані вказують на порушення метаболічних процесів в ураженій кадмієм печінці та показують гепатозахисну дію фолієвої кислоти, ймовірно обумовленої позитивним впливом на регенеративні процеси та антиоксидантними властивостями.

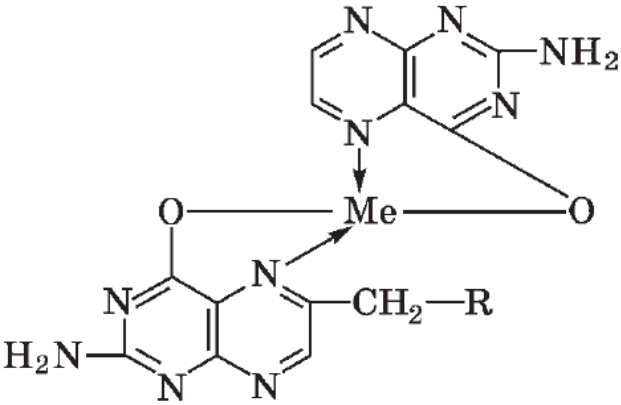
HEPATOPROTECTIVE FUNCTION OF FOLIC ACID DURING INTOXICATION BY CADMIUM

Kalinin I.V.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine
e-mail: ikalin@rambler.ru

The modern worsening environmental situation is one of the major concerns for the need of studying the mechanisms of adaptation of organisms to heavy metals as the most dangerous pollutants. High level of entering in organism causes significant metabolic disorders that ultimately affects health. Revelation of the mechanisms of adaptive reactions not possible without studying the antioxidant systems that are actively involved in biochemical processes of cell stress protection effects of various xenobiotics.

The folic acid have an important role in the reactions of synthesis of nucleic acids, proteins, metabolism of phospholipids, increases the catalytic activity of microsomal monooxygenases positively affects the function of liver, stimulates bile secretion, reduces fatty liver, caused by deficiency of choline in foods. The availability of molecules pterynoviy folic acid hydroxyl group and tertiary nitrogen atoms can bind heavy metal salts (Figure below).



The aim of this work was to apply folic acid after influences of cadmium sulfate in liver of rats.

The investigation was performed on white nonlinear rats-male same age, weighing 180-200 g. They were formed in two groups of animals: the first - intact (control), second - the animals orally entered solution of cadmium sulfate in doses of 1 / 30 of LD50 - 14 days and then within 10 days Intoxicated animals received folic acid at a dose of 0.1 mg / kg. After the experiment, rats were decapitated under ether anesthesia and liver tissue were taken for further research. The work was done in accordance with the Council of Europe conventions on the protection of vertebrate animals used for scientific purposes.

Found that intoxication of cadmium sulfate resulted in decrease of reduced glutathione (GSH) in 2,5 times, reduce superoxidedismutase (SOD) and catalase (CAT) 2 times against the control group in rat liver. However, the use of folic acid after cadmium poisoning contributed to the increase SOD activity by 32% and CAT activity by 28% and increasing the GSH content by 47% compared to Intoxicated animals.

Thus, the findings indicate a violation of metabolic processes in cadmium affected the liver and liver show the action of folic acid is probably caused by a positive impact on the regenerative processes and antioxidant properties.

ВЛИЯНИЕ D-ПАНТЕНОЛА НА ЭФФЕКТЫ D- И D, L-ГОМОПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ИХ ВВЕДЕНИИ

[1]Канунникова Н.П., [1]Аль-Хаммаш Н., [2]Гроховская Т.Ч., [2]Пеховская Т.А., [2]Лукиенко Е.П., [2]Омельянчик С.Н., [2]Мойсеенок А.Г.

[1] Гродненский государственный университет, Гродно, Беларусь
e-mail: n.kanunnikova@grsu.by
[2] Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси, Гродно, Беларусь
e-mail: val@biochem.unibel.by

Пантоильное производное ГАМК –D-гомопантотеновая кислота (D-ГПК, пантогам) было синтезировано в конце 50-х годов в Японии с целью улучшения проникновения ГАМК в мозг. Вскоре было установлено, что D-ГПК является эффективным ноотропным препаратом, оказывающим выраженное метаботропное, нейротрофическое и нейропротекторное действие, что и обусловило широкое применение пантогама в неврологической практике [1,2,3]. Изучение механизмов действия D-ГПК показало его влияние на $ГАМК_A$-рецепторы, систему метаболизма ГАМК, глутамина и глутатиона в ткани мозга [1,2,3]. Большой интерес исследователей вызвал тот факт, что пантогам оказался важным фактором регуляции уровня кофермента А (КоА), особенно заметным в условиях длительного введения больших доз D-ГПК и на фоне алиментарной пантотеновой недостаточности [4].

С целью потенцирования эффекта пантогама и предупреждения его неблагоприятных воздействий на энергетический и углеводный метаболизм нами было проведено изучение влияния сочетанного назначения субстанций гомопантотеновой кислоты и D-пантенола (ПЛ) крысам. При этом использовались препараты D-ГПК и DL-ГПК, так как ранее были установлены различия в биологической эффективности этих стереоизомеров [2]. Препараты D-ГПК и D,L-ГПК (300 мг/кг массы тела) сами по себе, а также совместно с ПЛ (100 мг/кг) вводили внутрижелудочно 1 раз в сутки в течение одного месяца. Установлено, что введение D,L-ГПК не влияет на уровень ТБКРС в крови крыс, тогда как при назначении D-ГПК отдельно либо в сочетании с ПЛ значение этого показателя снижается. Различия эффектов D-ГПК и ее рацемата отмечены также и в печени: хотя оба препарата повышали уровень ТБКРС, добавление ПЛ снижало этот показатель только на фоне D-ГПК. Введение D-ГПК отдельно либо в сочетании с ПЛ приводило к повышению активности ферментов метаболизма глутамина в печени при сочетанном назначении D-ГПК и ПЛ, тогда как сочетанное применение D,L-ГПК и ПЛ снижало активность глутаминаз и практически не влияло на активность глутаматдегидрогеназы. Введение ПЛ предотвращало снижение гликемии у животных с длительным назначением D-ГПК и восстанавливало уровень общего КоА и ацил-КоА в печени.

В мозге введение D-ГПК одного или вместе с ПЛ способствовало снижению активности ферментов метаболизма глутамина и глутамата. В то же время введение D,L-ГПК практически не оказало влияния на активность ферментов метаболизма глутамина и глутамата, тогда как сочетание D,L-ГПК и ПЛ снижало их активность. Таким образом, при введении D-ГПК наблюдалась активация системы глутамин-глутамат в печени при одновременном падении активности ферментов глутаминового цикла в мозге, что не снималось сочетанным применением препарата с пантенолом. Это свидетельствует в пользу избыточного накопления нейротоксичного глутамата в мозге с последующей его нейтрализацией в печени. Особенностью действия D,L-ГПК на систему “глутамат-глутамин” является падение активности фосфат-зависимой глутаминазы и стимуляция активности глутаматдегидрогеназ в печени на фоне подавления активности последнего в больших полушариях мозга. Добавление пантенола радикально изменяло направленность эффектов D,L-ГПК в сторону наработки глутамата в печени и больших полушариях мозга крыс. Полученные нами данные, очевидно, свидетельствуют о некотором угнетающем влиянии D-ГПК на развитие окислительного стресса в крови и печени и активирующем влиянии на метаболизм глутамина в печени при хроническом его введении крысам и гораздо более слабых эффектах рацемической смеси данного препарата. Эти тенденции сохраняются и при добавлении к препаратам ГПК D-пантенола.

Работа выполнена при финансовой поддержке совместного гранта БРФФИ-РФФИ Г10Р-021.

Литература:

1. *А.Г.Мойсеенок [и др.]* Биотрансформация предшественников биосинтеза кофермента А в структурах мозга // Весці НАН Беларусі. Сер.мед.навук. 2008.– №4.– С. 48-54.
2. *А.Г.Мойсеенок* Пантотеновая кислота: от универсального распространения к универсальным функциям // Биохимия, фармакол.и клин. прим. производных пантот.кислоты. – Гродно.– 2003.– С.107–114.
3. Пантогам и пантогам актив. Клиническое применение и фундаментальные исследования / под ред.д.х.н. В.М.Копелевича / Сб.научных статей. –М.- Триада-фарм.- 2009.- 188 с.
4. *Zhang Yong-Mei [et al.]* Chemical Knockout of Pantothenate Kinase Reveals the Metabolic and Genetic Program Responsible for Hepatic Coenzyme A Homeostasis // Chemistry & Biology, 2007, vol. 14, p.291-302.

INFLUENCE OF D-PANTHENOL ON EFFECTS OF D- AND D, L-HOPANTHENATE DURING THEIR CHRONIC INGESTION

[1]Kanunnikova N.P., [1]Al-Hammashi N., [2]Grohovskaya T.Ch., [2]Pehovskaya T.A., [2]Lukiyenko H.P., [2]Omelyanchik S.N., [2]Moiseenok A.G.

[1] Grodno State University, Grodno, Belarus
e-mail: n.kanunnikova@grsu.by
[2]Institute for Pharmacology and Biochemistry, Grodno, Belarus
e-mail: val@biochem.unibel.by

GABA's pantoyl derivative – D-hopanthenate (panthogam) was synthesized in Japan for better GABA penetration into the brain. Soon it was shown that D-hopanthenate was effective nootropic drug with significant metabotropic, neurotrophic and neuroprotector effects. Consequently, it began to be used in many neurological disease therapy [1,2,3]. Studying of mechanisms of D-hopanthenate action showed its influence on $GABA_A$-receptors, GABA, glutamine, and glutathione metabolism systems in the brain [1,2,3]. Researchers were interested in the fact that D-hopanthenate played an important role in the regulation of Coenzyme A level, especially following their chronic ingestion and diet pantothenic deficiency [4].

We studied effects of simultaneous consumption of the hopanthenate with D-panthenol by rats in order to reinforce hopanthenate action and to prevent its negative influence on metabolism of glucose and energy formation processes. We used D- and DL-forms of the hopanthenate because it was shown earlier that biological efficiency of the stereoisomers were different [2]. The D- and DL-substances (300 mg/kg) were injected into stomach per se or simultaneously with the D-panthenol (100 mg/kg) per day, during 1 month.

We showed that D,L-hopanthenate ingestion did not changed TBA-product levels in the rat blood, but the D-hopanthenate itself or with D-panthenol decreased the one. Different effects of the hopanthenate stereoforms were found in rat liver, too: both the substances increased the TBA-product levels, but the supplement of the D-panthenol decreased it only if it acted simultaneously with the D-hopanthenate. Consumption of the D-hopanthenate alone or with D-panthenol led to increase of glutamine metabolism enzyme activities in liver, whereas DL-hopanthenate and D-panthenol led to decrease of them. D-panthenol with DL-hopanthenate consumption prevented decrease of glucose level in blood and restored total CoA and acyl-CoA levels in liver.

Consumption of D-hopanthenate alone or with D-panthenol led to decrease of activities of glutamine and glutamate metabolism enzymes in the brain, whereas D,L-hopanthenate alone did not change their activities, but D-hopanthenate with D-panthenol caused decrease of them. Thus, during D-hopanthenate ingestion glutamine-glutamate system in the liver was activated, whereas activities of the glutamine metabolism enzymes in the brain was decreased. The D-panthenol supplement did not change these effects. It may be an evidence for accumulation of glutamate in the brain and following their destruction in the liver. Peculiarity of the DL-hopanthenate action was the fact that it caused decrease of glutaminase activity and increase of glutamate dehydrogenase activity in the liver, whereas the last one was decreased in the brain. Supplement of D-panthenol changed effects of DL-hopanthenate both in the liver and brain. The data obtained suggest that D-hopanthenate have some depressing influence on lipoperoxidation in the blood and liver and activating influence on the glutamine metabolism in the liver following its chronic consumption by rats. The DL-form of the hopanthenate acts less. These trends are reserved during simultaneous ingestion of the D-panthenol with the above substances.

The work was supported by joned grant of Belarus-Russia Research Fund No. G10R-21.

References:

1. *A.G.Moiseenok [et al.]* Biotransformation of Coenzyme A biosynthesis precursors in brain structures // News of Biomedical Sciences. 2008.– №4.– P. 48-54.
2. *A.G.Moiseenok*. Pantothenic acid: from universal spreading to universal functions // Biochemistry, pharmacology, and clinical use of pantothenic acid derivatives. Grodno.– 2003.– P.107–114.
3. Panthogam and panthogam active. Clinical use and fundamental studies / Ed. V.M.Kopelevich, PhD / Res.articles. –M.- Triada-pharm.- 2009.- 188 p.
4. *Zhang Yong-Mei [et al.]* Chemical Knockout of Pantothenate Kinase Reveals the Metabolic and Genetic Program Responsible for Hepatic Coenzyme A Homeostasis // Chemistry & Biology, 2007, vol. 14, p.291-302.

18β-ГЛІЦИРЕТИНОВА КИСЛОТА ПОПЕРЕДЖУЄ РОЗВИТОК ДОВГОТРИВАЛОЇ ТОНІЧНОЇ ФАЗИ ГІПОКСИЧНОЇ ЛЕГЕНЕВОЇ ВАЗОКОНСТРИКЦІЇ

Кізуб І.В., Соловйов А.І.

Інститут фармакології та токсикології Академії медичних наук України, Київ, Україна
e-mail: buzzmann@ukr.net

Відомо, що гіпоксія викликає звуження артерії легеневого кола кровообігу, що за нормальних фізіологічних умов оптимізує вентиляційно-перфузійне співвідношення в легенях, однак призводить до розвитку гіпоксичної легеневої гіпертензії. Також відомо, що тонічна фаза гіпоксичної легеневої вазоконстрикції (ГЛВ) повністю залежить від ендотелію та гліколізу, однак сигнальні шляхи, що до цього залучені, досі залишаються не з'ясованими (1). Метою нашого дослідження було, з використанням інгібітора щільних контактів (gap junctions) 18β-гліцретинової кислоти (18β-ГК, сапоніну, що виділений із кореня солодки, Glycyrrhizia glabra L.) (2, 3), з'ясувати їх роль у розвитку ГЛВ та, зокрема, перевірити гіпотезу про те, що сигналізація за участю щільних контактів може бути залучена до розвитку тонічної фази ГЛВ.

Зміни судинного тонусу реєструвалися в ізольованих сегментах дрібних внутрішньолегеневих артерій (ВЛА) щурів Wistar за допомогою міографу.

Гіпоксія (PO_2 - 2–3 мм рт. ст.) викликала двофазну скоротливу відповідь нескорочених та попередньо скорочених за допомогою простагландину $F_{2\alpha}$ (3 μМ) або 25 мМ K^+ ВЛА, що складалася із транзиторної фази I та тривалої тонічної фази II ГЛВ протягом 40-а хвилин аплікації гіпоксії. В ВЛА, попередньо скорочених простагландином $F_{2\alpha}$ або 25 мМ K^+ попередня 20-хвилинна аплікація інгібітору щільних контактів 18β-ГК (30 μМ) не впливала на транзиторну фазу ГЛВ ($P>0.05$), однак відміняла розвиток тонічної фази ($P<0.05$). Збільшення концентрації 18β-ГК до 60 та 100 μМ викликало значне пригнічення обох фаз ГЛВ ($P<0.05$). У ВЛА попередньо не скорочених, 30 μМ 18β-ГК також призводили до зменшення тонічної фази ГЛВ ($P<0.05$) без помітного ефекту на транзиторну фазу ($P<0.05$). Видалення ендотелію у ВЛА призводило до зниження амплітуди транзиторної фази ($P<0.05$) та зникнення тонічної фази ГЛВ, тоді як 30 μМ 18β-ГК посилювали ці ефекти ($P<0.05$). Таким чином, отримані нами дані вказують на те, що щільні контакти залучені до розвитку ГЛВ, відображуючи існування нового, досі не відомого сигнального шляху під час гіпоксичної дії на стінку легеневих артерій, який підтримує розвиток тривалої тонічної фази ГЛВ.

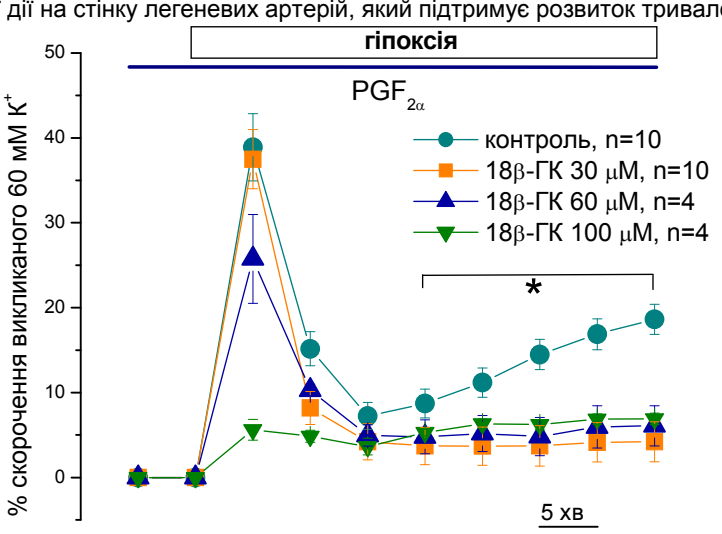


Рис. Ефект 18β-гліцретинової кислоти (18β-ГК) на ГЛВ у попередньо скорочених простагландином $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$, 3 μМ) ізольованих ВЛА щурів за умов гіпоксичної гіпоксії. * - P<0,05

Дослідження виконано за фінансової підтримки The Physiological Society Junior Fellowship Grant 2008-2009; The Royal Society International Travel Grant for Collaboration 2010/R1; and Disease Models and Mechanisms Journal Travelling Fellowship Grant 2010.

Література:

1. *Ward J.P.T. and McMurtry I.F.* (2009). Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction and their roles in pulmonary hypertension: new findings for an old problem. *Curr Opin Pharmacol*. 9(3): 287–296.
2. *Guan X., Wilson S., Schlender K.K., Ruch R.J.* (1996). Gap-junction disassembly and connexin 43 dephosphorylation induced by 18β-glycyrrhetinic acid. *Mol Carcinog.* 16: 157–164.
3. *Matchkov V.V., Rahman A., Peng H., Nilsson H. & Aalkjaer C.* (2004) Junctional and nonjunctional effects of heptanol and glycyrrhetinic acid derivates in rat mesenteric small arteries. *Brit J Pharmacol.* 142: 961–972.

18β-GLYCYRRHETINIC ACID PREVENTS SUSTAINED HYPOXIC PULMONARY VASOCONSTRICTION DEVELOPMENT

Kizub I.V., Soloviev A.I.

The Institute of Pharmacology and Toxicology of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine.
e-mail: buzzmann@ukr.net

It is known that hypoxia causes pulmonary artery constriction normally maintaining optimal ventilation-perfusion matching in the lung but leading to pulmonary hypertension development. Although it is known that sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) is critically dependent on the endothelium and glycolysis, the signaling pathways remain unclear (1). The aim of this study was using gap junctions inhibitor 18β-glycyrrhetinic acid (18β-GA) (2, 3), a saponin isolated from licorice root (Glycyrrhizia glabra L.), to determine gap junctions role in HPV, and specifically to test the hypothesis that signaling via these junctions contributes to development of the sustained phase of HPV.

The vascular tone was measured on isolated Wistar rat small intrapulmonary arteries (IPA) using a wire myography technique.

Hypoxia (PO_2 - 2–3 mmHg) elicited a biphasic response in tension in IPA without preconstriction or preconstricted with prostaglandin $F_{2\alpha}$ (3 μM) or 25 mM K^+ consisted of the transient phase I and the sustained HPV phase II during 40 min of hypoxia. 20 min prior application of gap junctions inhibitor 18β-GA (30 μM) had no effect on HPV transient phase (P>0.05) but abolished the sustained HPV in IPA precontracted with $F_{2\alpha}$ (3 μM) or 25 mM K^+ (P<0.05). Elevation in 18β-GA concentration to 60 and 100 μM evoked a significant suppressing of both HPV phases (P<0.05). In nonpreconstricted IPA, 30 μM 18β-GA also led to reduction of the sustained HPV (P<0.05) without effect on the transient HPV phase (P<0.05). Endothelium removing in IPA resulted in reduction in the HPV transient phase amplitude (P<0.05) and abolished the sustained HPV, whereas 30 μM 18β-GA enhanced this effect (P<0.05). Taken together, this data indicates that gap junctions involved to HPV development reflecting a novel pathway for signaling during hypoxia in pulmonary artery that supports the sustained phase of HPV.

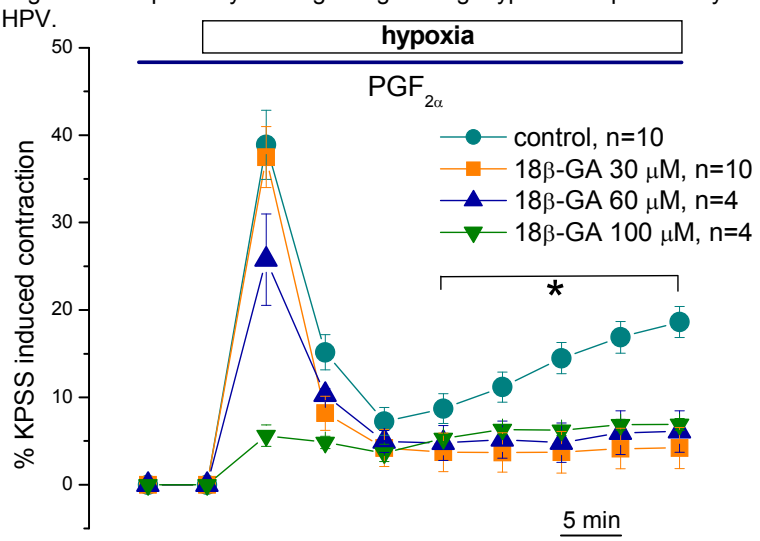


Fig. The effect of gap junctions inhibition with 18β-glycyrrhetinic acid (18β-GA) on HPV in isolated rat IPA precontracted with 3 μM PGF2α at hypoxic hypoxia. * - P<0,05

Acknowledgements: Supported by The Physiological Society Junior Fellowship Grant 2008-2009; The Royal Society International Travel Grant for Collaboration 2010/R1; and Disease Models and Mechanisms Journal Travelling Fellowship Grant 2010.

References:

1. *Ward J.P.T. and McMurtry I.F.* (2009). Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction and their roles in pulmonary hypertension: new findings for an old problem. *Curr Opin Pharmacol.* 9(3): 287–296.
2. *Guan X., Wilson S., Schlender K.K., Ruch R.J.* (1996). Gap-junction disassembly and connexin 43 dephosphorylation induced by 18β-glycyrrhetinic acid. *Mol Carcinog.* 16: 157–164.
3. *Matchkov V.V., Rahman A., Peng H., Nilsson H. & Aalkjaer C.* (2004) Junctional and nonjunctional effects of heptanol and glycyrrhetinic acid derivates in rat mesenteric small arteries. *Brit J Pharmacol.* 142: 961–972.

ЗАСТОСУВАННЯ ГАЛЕГИ ЛІКАРСЬКОЇ (GALEGA OFFICINALIS L.) ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ 1-ГО ТИПУ НОРМАЛІЗУЄ ПОКАЗНИКИ ЛЕЙКОЦИТАРНОЇ ФОРМУЛИ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЩУРІВ

Клевета Г., Хохла М., Соліляк З., Чайка Я., Сибірна Н.

Львівський національний університет імені Івана Франка, Львів, Україна
e-mail: khmarija@gmail.com

Провідні експерти–діабетологи світу відносять цукровий діабет до аутоімунних захворювань [1-3]. При цьому в організмі утворюються антитіла, що пошкоджують інсулінопродукуючі клітини острівців Лангерганса в підшлунковій залозі. Незважаючи на те, що інсулінзалежний цукровий діабет є багатофакторним захворюванням, на сьогоднішній день не існує іншого способу його лікування, крім інсулінотерапії, яка не виліковує хвороби, а має тимчасовий заміщуючий характер, тому набуває актуальності розробка протидіабетичних препаратів нового покоління з принципово новими механізмами дії. Поряд з традиційними методами лікування цукрового діабету широкого застосування набувають альтернативні, допоміжні засоби, серед них фітотерапія. Особливої уваги заслуговують цукрознижуючі препарати Галеги лікарської, які можуть бути перспективними не лише при лікуванні хворих на цукровий діабет 2-го типу, а і 1-го типу у зв'язку з можливістю відновлення β -клітин острівців Лангерганса, що є особливо актуальним.

Зважаючи на надзвичайно високу чутливість системи крові до різних фізіологічних і, особливо, патологічних впливів на організм метою даної роботи було провести аналіз змін лейкоцитарної формули периферичної крові щурів за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу та введення препарату Галеги лікарської у дозі 0,6 г/кг маси тіла тварини.

Експериментальний діабет індукували введенням стрептозотоцину (Sigma, США) доочеревинно в дозі 5,5 мг на 100 г маси тіла тварини. Препарат Галеги лікарської отримували шляхом настоювання надземної частини Галеги лікарської у 96% етиловому спирті в співвідношенні 1:5. Екстракт упарювали у вакуумі при температурі 45-50^{0}С. Отриманий залишок розділяли на алкалоїдвмісну та безалкалоїдну фракції. Для роботи використовували безалкалоїдну фракцію (далі препарат Галеги лікарської).

Для оцінки різних ланок імунної системи контрольних та діабетичних щурів було проаналізовано зміни лейкоцитарної формули периферичної крові. За умов цукрового діабету встановлено підвищення кількості паличкоядерних (на 8,8%) та сегментоядерних нейтрофілів (на 20,2%) та зниження кількості лімфоцитів (на 26%) порівняно з контролем. Вміст базофілів і моноцитів не відрізнявся від контрольних показників. Введення препарату Галеги лікарської діабетичним тваринам впродовж 12 днів сприяло нормалізації показників лейкоцитарної формули: кількість лімфоцитів підвищувалася на 18,3-20,9, вміст сегментоядерних та паличкоядерних нейтрофілів знижувався на 12,1- 13,9% та 5-11,4% відповідно.

За умов цукрового діабету встановлено вірогідне зниження кількості лейкоцитів (на 41%) порівняно з контролем. Введення препарату Галеги лікарської впродовж 12 днів приводить до нормалізації кількості лейкоцитів, що проявляється у зростанні їх кількості на 16-43% щодо діабету впродовж всього періоду експерименту.

Введення препарату Галеги (0,6 г/кг маси тіла) лікарської тваринам за умов цукрового діабету сприяє нормалізації показників лейкоцитарної формули.

Література:

1. *Kukreja A., Maclaren N.* Autoimmunity and diabetes. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 1999; 84: 4371-4378.
2. *Notkins A. L., Lernmark Å.* Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues *J Clin Invest.* 2001, 108(9):1247–1252.
3. *Tisch R., McDevitt H.* Insulin-Dependent Diabetes mellitus. Cell, 1996; 85: 291–297

THE USE OF GALEGA OFFICINALIS L. IN TYPE 1 EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS LEADS TO NORMALIZATION OF DIFFERENTIAL COUNT OF RATS' PERIPHERAL BLOOD

Kleveta G., Khohkla M., Soliliak Z., Chayka Ya., Sybirna N.

Department of Biochemistry, Ivan Franko National University of L'viv, L'viv, Ukraine
e-mail: khmarija@gmail.com

Leading world diabetic experts refer diabetes to autoimmune diseases [1-3]. Under this condition antibodies that damage the cells of pancreas Langerhans islets are formed in the body. Despite the fact that insulin depended diabetes is multifactorial disease, today there is no other way of its treatment, than insulin therapy, which does not cure the disease, but has a temporary replacing nature, therefore it is important to develop a new generation of antidiabetic drugs with fundamentally new mechanisms of action. Alongside with the traditional methods of diabetes treatment alternative, subsidiary aids become widely used,that includes herbal medicine. Particular attention should be paid to Galega officinalis' sugar lowering preparations that may be seem promising not only in treating patients with diabetes mellitus type 2, but also with type 1 in connection with the having the ability to restore β-cells of islets of Langerhans, the fact that is of extreme importance.

Considering the extremely high blood sensitivity to various physiological and especially pathological exposures the purpose of this work was to analyze differential count of rats' peripheral blood under diabetes mellitus type 1 and the Galega officinalis' applicationa dose of0.6 g/kg of animal weight.

Experimental diabetes was induced by inter-abdominal injection of streptozotocin (Sigma, USA) in a dose of 5,5mg per 100g body weight of animals. Alcohol extract was produced by infusion of above-ground parts of Galega officinalis in 96% ethanol at a ratio of 1:5 at room temperature. The extract was evaporated in vacuum at a temperature of 45-500C. The resulting Galega officinalis alcoholic extract was divided into water (alkaloid-containing) and chloroform (nonalkaloid) fractions. Nonalkaloid fraction (further Galega officinalis preparation) was Under the condition of diabetes the increase of band neutrophils (at 8,8%), polymorphonuclear neutrophils (at 20,2%) and decrease of lymphocytes amount compared with control was observed. Number of basophils and monocytes did not differ from the control group. Galega officinalis preparation application to diabetic animals for 12 days promoted the normalization of leukocyte formula: the lymphocytes number increased by 18,3-20,9%, of polymorphonuclear and band neutrophils decreased by 12,1 - 13,9% and 5-11,4%, respectively.

Under the condition of diabetes reduction of leukocytes count (41%) as compared with control was established. 12 days' Galega officinalis preparation application leads to leukocytes count normalization, which results in the increase of the number by 16-43% as compared to diabetes during the entire period of the experiment.

Galega officinalis preparation application (0.6 g/kg of body weight) to animals with diabetes contributes to normalization of leukocyte formula.

References:

1. *Kukreja A., Maclaren N.* Autoimmunity and diabetes. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 1999; 84: 4371-4378.
2. *Notkins A. L., Lernmark Å.* Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues J Clin Invest. 2001, 108(9):1247–1252.
3. *Tisch R., McDevitt H.* Insulin-Dependent Diabetes mellitus. Cell, 1996; 85: 291–297

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА И ГИПОТЕНЗИВНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ОРИГИНАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА ФИТОКАРДИН

Ковалева А.М., Авидзба Ю.Н., Сидора Н.В., Комисаренко А.Н.

Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина
e-mail: allapharm@yahoo.com

Исследование фенольных соединений 12 видов боярышников флоры Украины позволило определить химический профиль рода, который характеризуется наличием гиперозида, витексина, ацетилвитексина, хлорогеновой и неохлорогеновой кислот.

С помощью химических, физико-химических методов анализа в плодах, цветках и листьях украинских и североамериканских неофицинальных видов рода Боярышник были идентифицированы и установлена структура 107 соединений, среди которых простые фенольные соединения, гидроксикоричные кислоты, кумарины, флавоноиды, фенилизопропаноиды, производные бензола, терпеноиды, аминокислоты, жирные кислоты и др.

С использованием препаративной бумажной и адсорбционной колоночной хроматографии на полиамидном сорбенте выделены в индивидуальном состоянии 20 веществ фенольной природы.

Кардиотонические эффекты препаратов боярышника подробно изучены и описаны в литературе. Боярышник обладает выраженным коронарорасширяющим действием, положительным инотропным и отрицательным хронотропным эффектами, умеренно выраженной симпатолитической активностью. Так, при введении настойки боярышника, приготовленной из свежих плодов, кроликам в дозе 0,4 мл на 1кг массы тела наблюдается увеличение амплитуды сердечных сокращений на 125% и урежение ритма сердечных сокращений в среднем на 15-20%. В экспериментах на животных установлено, что водные экстракты пустырника в дозах 0,25-0,8 мл/кг оказывают гипотензивное и кардиопротекторное действие, снижают спонтанную двигательную активность животных, потенцируют снотворные эффекты наркотиков, обладают антагонистическими эффектами по отношению к действию судорожных аналептиков; шишки хмеля обладают седативным, анальгетическим, антибактериальным, транквилизирующим, снотворным, диуретическим, гипосенсибилизирующим действием.

Разработан состав и подобраны технологические параметры получения жидких экстрактов из плодов боярышника. На их основе нами получен комплексный препарат “Фитокардин”, в состав которого входят ингибитор АПФ эналаприл, диуретик индапамид и фитопрепараты сердечнососудистого действия: настойки пустырника и боярышника и экстракт хмеля. В сырье и настойках боярышников, пустырника и экстракте хмеля определено количественное содержание органических кислот, аскорбиновой кислоты, гидроксикоричных кислот, флавоноидов, полифенолов и каротиноидов.

Впервые установлена гипотензивная активность жидких экстрактов, полученных из нового вида сырья – плодов североамериканских видов боярышников – боярышника Арнольда, боярышника мягковатого и боярышника канадского, культивируемых в Украине.

Введение в состав “Фитокардина” рассчитанных количеств растительных вытяжек позволяет снизить суточную дозу синтетических антигипертензивных препаратов и, благодаря этому, уменьшить риск и выраженность присущих им побочных эффектов.

В опытной группе крыс однократное внутрижелудочное введение “Фитокардина” в минимальной дозе вызывает спустя 1 час умеренное, но достоверное снижение уровня АД на 14,6%. В дальнейшем АД продолжает снижаться и максимальный антигипертензивный эффект препарата (-25,7%) регистрируется на 4 часе наблюдения. На протяжении последующих 22 часов уровень АД у крыс этой группы очень медленно возрастает, оставаясь достоверно ниже исходной величины. Восстановление АД до исходного уровня происходит только через 28 часов после введения препарата.

Препарат в диапазоне изученных доз через 1 час после введения и на протяжении последующих 24-28 часов наблюдения оказывает дозозависимый антигипертензивный эффект. Фитокардин обладает выраженным антигипертензивным действием, профиль которого совпадает с профилем антигипертензивного действия основного действующего вещества – эналаприла.

Биологически активные вещества растительного происхождения (С-гликозиды апигенина, гликозиды лютеолина, кверцетина, кумарины, процианидины, моно- и сесквитерпеноиды, бетаины) позволили достичь выраженный антигипертензивный эффект препарата Фитокардина в значительно более низких дозах, чем эффекты монопрепаратов эналаприла и индапамида. По выраженности и продолжительности действия сопоставимыми являются дозы Фитокардина 4 мл/кг (2,5 мг/кг по эналаприлу и монопрепарата эналаприла – 20 мг/кг). Антигипертензивный эффект препарата Фитокардин носит дозозависимый характер: 4-х кратное повышение дозы Фитокардина (16 мл/кг) у крыс приводит к чрезмерному снижению уровня АД и развитию симптомов передозировки.

Обобщая полученные результаты изучения БАВ и антигипертензивного действия исследуемого препарата, можно сделать выводы: антигипертензивный эффект “Фитокардина” обусловлен потенцированием действия его отдельных компонентов на различные звенья АГ; фармакологическая активность “Фитокардина” проявляется в значительно более низких дозах, чем монопрепаратов эналаприла и индапамида: рекомендуемая доза комбинированного препарата “Фитокардина” в 4,0 раза ниже суточных среднетерапевтических доз монопрепаратов эналаприла и индапамида.

BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES AND HYPOTENSIVE ACTIVITY OF NEW ORIGINAL PREPARATION PHYTOCARDIN

Avidzba Yu.N., Sydora N.V., Kovalyova A.M., Komissarenko A.N.

National University of Pharmacy, Kharkov, Ukraine
e-mail: allapharm@yahoo.com

A research of phenolic compounds of 12 hawthorn species from Ukrainian flora allowed to determine genus' chemical profile, which is characterized by a presence of hyperoside, chlorogenic and neochlorogenic acids, vitexine, acetylvitexine.

With the help of chemical, physical and chemical methods in fruits, flowers and leaves of ukrainian and North-American unofficial species of Hawthorn was identified and established a structure of 107 compounds, among them simple phenolic compounds, hydroxycinnamic acids, coumarins, flavonoids, terpenoids, phenylisopropanoids, benzene derivatives, amino acids, fatty acids, etc.

Using preparative paper and adsorption column chromatography on polyamide sorbent 20 compounds of phenolic nature in individual state were isolated.

Cardiotonic effects of hawthorns preparations were studied and described in literature. Hawthorn has a pronounced coronarolitic effect, positive inotropic and negative chronotropic effects, moderate simpatolitic activity. In case of infusion of hawthorn's fresh fruits tincture to rabbits in dose 0,4 ml/kg of body mass, an increase of amplitude to the 125% and a delay of heart systole rhythm to 15-20% were observed.

In experiments on animals it was established, that motherwort water extracts in dose 0,25-0,8 ml/kg have hypotensive and cardioprotective activity, reduce animals' spontaneous moving activity, potent somnolents effects of drugs, have antagonistic effects to the effects of convulsive analeptics.

Is known, that hops cones have sedative, analgetic, phytoncydic, antibacterial, tranquilizer, somnolents, diuretics, hyposensibilisation activity.

A composition of liquid extracts from fruits of hawthorns species was developed and technological parameters of their receiving process had been selected. On their basis we have developed a complex preparation "Phytocardin", which includes ACE inhibitor enalapril, diuretic indapamin and phytopreparations of cardiovascular action: motherwort and hawthorn tinctures and hop extract. In motherwort and hawthorn tinctures and hop extract organic acids, ascorbic acid, hydroxycinnamic acids, flavonoids, polyphenolic compounds and carotenoids were quantified.

For the first time hypotensive activity of fluid extracts, obtained from new species of medicinal raw material – fruits of North-American hawthorn species – Arnoldi hawthorn, soft hawthorn, Canadian hawthorn was established, cultivated in Ukraine.

Introduction of vegetable components into composition of "Phytocardin" allows to reduce daily dose of synthetic antihypertensive preparations, and due to that to reduce the risk and intensity of side effects inherent in those preparations.

In the experimental group of rats, one-time endogastric introduction of "Phytocardin" (min dosage) causes moderate but reliable reduction in blood pressure (BP) level by 14.6 % in one hour. Later BP continues to come down, and max antihypertensive effect of the preparation (-25.7 %) shall be registered during the 4th hour of observations. During the following 22 hours, BP level in this group of rats shall increase very slowly remaining significantly lower than initial value. BP will return to its initial level only in 28 hours after introduction of the preparation.

Phytocardin possess expressed antihypertensive action, which profile coinsides with enalapril's profile of antihypertensive action – main active compound.

Biologically active substances of plant origin: C-glycosides of apigenin, glycosides luteolin and quercetin, coumarins, procyanidins, mono- and sesquiterpenoids, betaines of Phytocardin preparation allowed to achieve the expressed antihypertensive effect in considerably low dosage, in comparison with effects of monopreparations enalapril and indapamid. By expression and duration of action comparable are dosages of Phytocardin is 4 ml/kg (2,5 mg/kg on enalapril) and monopreparation enalapril – 20 mg/kg.

Antihypertensive effect of Phytocardin preparation has dosage depended character. Increasing of Phytocardin dosage (16 ml/kg) in 4 times in rats leads to the extra lowering of arterial pressure level and to the development of overdose symptoms.

Summarizing the results of study of the tested preparation's antihypertensive effect, we can make the conclusions as follows: at first, antihypertensive effect of "Phytocardin" is caused by potentiation of effect of separate components on different arterial hypertension components; secondly, pharmacological activity of "Phytocardin" becomes apparent in significantly lower doses than in case of monopreparations such as enalapril and indapamin. The recommended dosage of combined preparation "Phytocardin" is 4.0 times lower than daily average therapeutic doses of monopreparations enalapril and indapamin.

ЕФЕКТИ ДІЇ ПРИРОДНИХ АНТИОКСИДАНТІВ НА СТРУКТУРУ КЛІТИН СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО УЛЬЦЕРОГЕНЕЗУ

Ковальова В.А., Шевченко А.Е., Шелест Д.В., Степанов Ю. В., Томачинська Л.І.

Київський національний університет ім. Т. Шевченка, Київ, Україна,
e-mail: vikikov@univ.kiev.ua

Виразкова хвороба шлунка (ВХШ) - це хронічне рецидивуюче захворювання, що супроводжується появою виразкових дефектів слизової оболонки шлунка. Ця хвороба є однією з найпоширеніших в Україні. За різними літературними даними вона вражає від 1% до 15% населення [1].

Не дивлячись на успіхи у консервативному лікуванні ВХ у значної частини хворих спостерігається прогресуюче ускладнення протікання захворювання. І хоча в останні роки був зроблений значний прогрес у розвитку фармакології та створено широкий арсенал лікарських засобів, лікування ВХ залишається проблемою сучасності. Тому особливого значення набувають подальші дослідження, які змогли б пояснити причини і механізм виникнення даної патології.

Останнім часом приділяється велика увага дослідженню структурних компонентів клітин слизової оболонки шлунка (СОШ). Білки та ліпіди є найголовнішими структурними компонентами клітин, які виконують провідну роль у клітинному метаболізмі та відіграють першорядну роль у регуляції внутрішньоклітинних процесів. Відомо, що в основі порушення структури клітин лежить складний комплекс взаємозв'язаних та взаємозумовлених процесів, які охоплюють як білкову, так і ліпідну фази. Тому дослідження білкового і ліпідного складу клітин слизової шлунка є необхідною ланкою при вивченні даної патології.

В останні роки для лікування різних патологій широко використовують препарати природного походження, наприклад сквален і аммівіт.

Аммівіт - натуральний комплекс легкозасвоюваних біологічно активних речовин, які отримують із дріжджів - сахароміцетів виноградного сусла. До складу аммівіту входять12 вітамінів групи В, вітаміни С,К,Е,D2,PP, каротиноїди, в т. ч b-каротин, а також 8 незамінних і 10 замінних амінокислот, 18 життєво необхідних макро- та мікроелементів та дуже важливий комплекс - b-ситостерин (антагоніст холестерина, складає 83,5% від загального вмісту стеринової фракції). Представлений в аммівіті комплекс біологічно активних речовин виявляє активний багатогранний стабілізуючий вплив на гомеостаз організму.

Сквален – це вуглецева сполука, яка є похідною ізопрена, попередник тритерпенів та стероїдних сполук. Препарат має широкий спектр позитивних фармакологіних властивостей, сприяє підвищенню загальної резистентності організму.

Фізіологічні характеристики сквалену та аммівіту, їх антисекреторні, цитопротекторні та антиоксидантні властивості обумовили мету нашого дослідження.

Метою роботи було дослідити вплив сквалену та аммівіту на ліпідно-білковий склад клітин слизової оболонки за умов етанолової виразки шлунка.

В дослідах використовували білих нелінійних щурів. Етанолову модель виразки створювали за методом Окабе. Розділення та кількісне визначення нативних білків проводили за методом Леммлі. Екстракцію ліпідів з клітин шлунка для визначення їх окремих фракцій проводили за методом Кейса. Кількісний вміст ліпідних фракцій оцінювали за допомогою денситометру. Статистичну обробку результатів проводили на IDV PC ET з використанням стандартних пакетів прикладних програм.

В результаті дослідження білкового складу було встановлено, що на 3-тю добу після виразкоутворення спостерігалась деградація фракцій білків з молекулярними масами 72, 89, 95 та 99 кДа порівняно з контролем. Ця ж картина зберігалась і на 5-ту добу експерименту.

Після введення аммівіту щурам з етаноловою виразкою встановлено статистично достовірне відновлення груп білків з молекулярною масою 89, 95 та 99 кДа у загальній фракції клітин СОШ на 3 добу. При цьому білок з молекулою масою 72 кДа не відновлюється. Подібна тенденція зберігалась і на 5-ий день досліджень.

При комбінованому додаванні аммівіту та сквалену за етанолової моделі виразки шлунка спостерігались результати подібні до отриманих за умов використання аммівіту окремо.

Також нами було проведено комплексне дослідження ліпідного складу клітин СОШ: вмісту фракцій нейтральних та фосфоліпідів в динаміці етанолової експериментальної моделі виразки.

Згідно з отриманими результатами, встановлено, що виразка викликає різнонаправлені зміни вмісту ліпідів.Так, при етаноловій моделі на 5 добу було встановлено зниження вмісту холестеролу в 1,5 рази та триацилгліцеролу в 2 рази. Введення тваринам досліджуваних антиоксидантів природного походження призводило до нормалізації вмісту холестеролу та підвищувало вміст триацилгліцеролу в 1,5 рази.

Дослідження фосфоліпідного складу клітин СОШ щурів за етанолової моделі виразки показало зниження головних фракцій фосфоліпідів на 5 добу: фосфатидилінозитолу (ФІ) в 1,5 рази і фосфатидилетаноламіну (ФЄА) в 2 рази, вміст жирних кислот підвищувався в 3 рази. Введення антиоксидантів-імуномодуляторів нормалізувало вміст досліджуваних фосфоліпідів та знижувало вміст жирних кислот.

Таким чином, отримані результати дозволяють заключити, що сквален та аммівіт володіють потужними антиоксидантними властивостями, введення їх тваринам сприяє нормалізації ліпідно-білкового складу клітин слизової оболонки шлунка за умов виразки, що сприяє відновленню структурно-функціонального стану слизової. Тому ці сполуки можуть бути рекомендовані для використання в комплексному лікуванні виразкової хвороби шлунка.

Література:

1.*Василенко В.Х., Гребенев А.Л., Шептулин А.А.* Язвенная болезнь.— М.: Медицина. - 1987. — 285 с.

EFFECTS OF NATURAL ANTIOXIDANTS ON THE STRUCTURE OF RATS GASTRIC MUCOSAL CELLS UNDER EXPERIMENTAL ULCERATION

Kovalyova V., Shevchenko A., Shelest D., Stepanov U., Tomachinskaya L.

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

Gastric ulcer disease (GUD) - is a chronic relapsing disease which is accompanied by the appearance of gastric ulcer. It is one of the most common diseases in Ukraine. According to various literature data it affects from 1% to 15% of the population [1] .

Despite advances in conservative treatment of GUD in most of the patients a progressive complication of disease's passing is observed. Although in recent years had made substantial progress in pharmacology and was developed a wide arsenal of medications, treatment GUD remains a problem today. Therefore particularly important is realization of further researches that could explain the causes and mechanism of this pathology.

Recently much attention is paid to study the structural components of gastric mucosal cells (GMC). Proteins and lipids are the most important structural components of cells that perform a key role in cellular metabolism and play a primary role in the regulation of intracellular processes. It is known that in the basis of violation of cell's structure is a complex of interrelated processes which include both protein and lipid phase. Therefore, studies of protein and lipid composition of gastric mucosal cells is an essential part in the study of this pathology.

In recent years for the treatment of various pathologies is commonly used drugs of natural origin, such as squalene and ammivit.

The composition of ammivit includes 12 B vitamins, vitamins C, K, E, D2, PP, carotenoids, including b-carotene,8 essential and 10 raplacement aminoacids, 18 vitally macro- and microelements and important complex - b-sytosteryn (antagonist of cholesterol, is 83,5% of the total content of sterol fraction).Presented in ammivit complex of biologically active compounds exerts a multifaceted active stabilizing effect on the homeostasis of organism.

Squalene - is a carbon compound that is a derivative of isoprene, a predecessor of triterpenes and steroidal compounds. The substance has a wide range of positive pharmacology properties, improves the overall resistance of the organism.

Physiological characteristics of squalene and ammivit and their antisecretory, cytoprotective and antioxidant properties caused our goal of investigation.

The purpose of the study was to explore the effects of squalene and ammivit on lipid-protein composition of mucosal cells under ethanol ulceration.

Nonlinear white rats were used. Ethanol ulcer model was induced by the method of Okabe. Separation and quantification of native proteins was performed by the method of Lemmli. Extraction of lipids from the cells of the stomach to determine their individual fractions was performed by the method of Case. Quantitative lipid fractions was estimated by densitometer. Statistical processing of results was performed on IDV PC ET using standard software packages.

As a result of the investigation of protein's composition has been found that on the 3-rd day after ulceration was observed degradation of protein fractions with molecular masses 72, 89 and 95 kDa compared with the control. The same picture was preserved on the 5-th day of the experiment.

After the entering of ammivit to rats with ulcer model, a statistically significant recovery of protein groups with molecular weight 89, 95 and kDa in the total fraction of GMC was discovered on the 3-rd day. But for all that protein with molecular weight of 72 kDa was not restored. A similar trend is preserved on the 5-th day of research.

In ethanol ulcer model under the combined addition of ammivit and squalene observed results is similar to obtained by using the ammivit separately.

We also conducted a comprehensive study of lipid composition of GMC: fractions of neutral and phospholipids in dynamics of experimental ulcer model.

According to obtained results were found that ulcer causes different changes of lipid content. So, under ulcer model on the 5-th day the contents of cholesterol and triacylglycerol were found to decrease in 1,5 and 2 times accordingly. Introduction of studied substances led to normalization of cholesterol content and to increasing of triacylglycerol content in 1,5 times.

Investigation of phospholipid composition of GMC in rats under ulceration showed decreasing of the main phospholipid fractions on the 5-th day: phosphatidylcholine (FCh) in 1,5 times and fosfatydyletanolamin (FEA) - in 2 times, fatty acids content increased in 3 times. The introduction of studied antioxidants-immunomodulators normalize content of phospholipids and increase content of fatty acids.

Thus, obtained results allow to conclude that squalene and ammivit have powerful antioxidant properties, adding this substances normalize lipid-protein composition of gastric mucosal cells under ulceration conditions that helps restore of structural and functional state of the mucous coat of stomach. Therefore, these compounds can be recommended for use in treatment of peptic ulcer stomach.

References:

1.*V.Vasilenko, A.Grebenev, A.Sheptulyn.* Yazvennaya bolezn .- Moscow: Medicine. - 1987. - 285 p.

МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЛИДОКАИНА И ПЕРОКСИНИТРИТА НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

[1]Коваленко Е.И., [2]Стародубцева М.Н., [1]Ханило Л.С.

[1]Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
e-mail: kavalenka@bsu.by
[2]Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

Лидокаин ((2-диэтиламино)-N-(2',6'-диметилфенил) ацетамид) является блокатором потенциалзависимых Na^+-каналов возбудимых мембран нейронов и кардиомиоцитов, что лежит в основе его традиционного применения как анестетика при хирургических манипуляциях и антиаритмического средства в кардиологической практике. Лидокаин способен вызывать множество других эффектов, среди которых влияние на активность клеток, участвующих в воспалении и тромбообразовании **(1).** Действие лидокаина на клетки крови не связано с изменением активности потенциалзависимых Na^+-каналов, поскольку они отсутствуют в мембранах этих клеток. К ключевым клеткам иммунной системы, принимающим участие в воспалительных процессах при инфекциях, аллергических и аутоиммунных заболеваниях, атеросклерозе, травмах относятся нейтрофилы **(2-4)**. Вовлечение нейтрофилов в воспаление сопровождается формированием ими высокоактивных форм кислорода и азота (АФК и АФА) $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2, ·OH, HOCl, ONOO, способных приводить к уничтожению патогенных микроорганизмов, вызывать цитодеструктивные эффекты, усиливать воспаление и индуцировать развитие окислительного стресса **(1,2-4).** Пероксинитрит (ONOO) образуется локально в местах воспаления при взаимодействии супероксида ($O_2^{\cdot-}$), генерируемого НАДФН-оксидазой, с монооксидом азота (NO), формируемого индуцибельной NO-синтазой нейтрофилов, моноцитов и других клеток **(5-7)**. Имеется ряд патологий, в развитии которых доказана важная роль NO, АФК, нейтрофилов**,** что определяет актуальность изучения процессов взаимодействия этих элементов друг с другом и способов их регуляции.

Целью данной работы было исследовать влияние лидокаина и ONOO на активность нейтрофилов *in vitro* при раздельном и сочетанном действии веществ.

Работа выполнена с применением методов хемилюминесценции, световой микроскопии, атомной силовой микроскопии, спектрофотометрии согласно методикам, описанным в работах **(7,8).** Нами установлено, что ONOO в концентрациях 10-100 мкМ оказывает регуляторное действие на нейтрофилы. ONOO приводит к усилению генерации АФК клетками, активированными в ходе адгезии и действии хемотаксического пептида fMLP, ускоряет дегрануляцию нейтрофилов и секрецию во внеклеточное пространство миелопероксидазы (МПО), вызывает нитрование субстратов в отсутствие и в присутствии пероксидаз, в том числе нитрование белков по тирозину, индуцирует сильные морфологические изменения нейтрофилов и формирование нейтрофилами сети внеклеточных ловушек (NET). Следует отметить, что сети NET, сформированные из «выброшенных» во внеклеточную среду ДНК и цитозольных белков, участвуют в разрушении материала в очаге воспаления и могут наблюдаться и при сохранности жизнеспособности нейтрофилов **(9).** Обнаружено, что лидокаин в концентрациях 0,2-2 мМ, сравнимых с достигаемыми при традиционной терапии, приводит к снижению генерации АФК нейтрофилами, активируемыми в ходе адгезии, ингибирует окисление субстратов пероксидазами, тормозит секрецию из нейтрофилов МПО, вызываемую активацией клеток при адгезии и действии хемоаттрактанта fMLP. При сочетанном воздействии ONOO и лидокаина проявляется антагонизм. Лидокаин ингибирует ONOO-индуцированное усиление процессов генерации АФК нейтрофилами, нитрование субстратов в пероксидазных системах, секрецию МПО, формирование NET. Действие лидокаина частично может быть связано с прямым взаимодействием лидокаина с ONOO, приводящим к распаду ONOO.

Полученные данные свидетельствуют о том, что ONOO может служить усилителем активности нейтрофилов и стимулировать как уничтожение инфекционных микроорганизмов, так и способствовать прогрессированию воспалительных заболеваний, в том числе таких, как кардиоатеросклероз. Лидокаин способен оказывать защитное действие в отношении тканей организма-хозяина, подавляя активность нейтрофилов и ингибируя эффекты ONOO.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке БРФФИ (проект Б09-020).

Литература:

1. *M.W. Hollmann, E.D. Durieux* // Local anesthetics and Inflammatory response -Anesthesiology, 2000, v.93, N5, p.858-875.
2. *M. Häger, J. Cowland, N. Borregaard* // Neutrophil granules in health ***and*** disease - J.Intern.Med, 2010, v.268, N1, p.25-34.
3. *Е.И. Коваленко, Е.В. Ковш, Г.Н. Семенкова, И.Э. Адзерихо, С.Н. Черенкевич.* // Изменение показателей фагоцитарного и гуморального иммунитета у больных со стенокрадией напряжения функционального класса III при прогрессировании заболевания - Новости медико-биологических наук, 2011, т.3, N1, с. 45-51.
4. *B.M. Babior* // NADPH oxidase. - Curr. Opin. Immunol, 2004, v.16, N1, p. 42–47.
5. M.N. Starodubtseva, A.I. Kavalenka, D.R. Petrenyov, S.N. Cherenkevich. // Effects of peroxynitrite on morphology and functions of neutrophils - “Handbook of free radicals: formation, types and effects” Eds.: D. Kozyrev, V. Slutsky. Series: Cell Biology Research Progress. Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, Inc., 2010, p. 479-503.
6. *S. Baldus, T. Heitzer, J.P. Eiserich.* // Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion - Free Radic. Biol. Med., 2004, v.37(6), p. 902-911.
7. *М.Н. Стародубцева, Е.И. Коваленко, Н.И. Егоренков, Д.Р. Петренев, С.Н. Черенкевич.* // Пероксинитрит регулирует экзоцитоз гранул нейтрофилов - Биол. мембраны, 2010, т. 27, N6, с. 459-470.
8. *A.I. Kavalenka, G.N. Semenkova, S.N. Cherenkevich.* // Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro - Cell Tissue Biology, 2007, v.1, N6, p. 551-559.
9. *F. Wartha, K. Beiter, S. Normark, B. Henriques-Normark.* // Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis – Curr. Opin. Microbiol., 2007, v.10, (1), p. 52-56.

MODIFICATING ACTION OF LIDOCAINE AND PEROXINITRITE ON STRUCTURE FUNCTIONAL PROPERTIES OF HUMAN BLOOD NEUTROPHILS

[1]Kavalenka A.I., [2]Starodubtseva M.N., [1]Hanilo L.S.

[1]Belarusian State University, Minsk, Belarus
e-mail: kavalenka@bsu.by
[2]Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Lidocaine ((2-diethylamino)-N-(2',6'-dimethylphenyl) acetamide) is known to block voltage-operated Na^+-gates in neuron and cardiacmyocyte excitable membranes. This property underlies of lidocaine traditional application as anesthetic drug for surgical operation and as antiarrhythmic drug in cardiology. Lidocaine is able to induce the number of the other effects that including its influence on activity of the cells which participate in inflammation and thrombosis **(1).** Lidocaine action on blood cells is not related with voltage-operated Na^+-gate activity changes, because blood cells are not express such channels. Among the key cells of immune system that take part in the inflammatory response during infections, allergy, autoimmune diseases, atherosclerosis, trauma are neutrophils **(2-4)**. Neutrophil involvement in inflammation is associated with the formation of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2, ·OH, HOCl, ONOO, which be able to destroy of pathogenic microorganisms, to amplify of inflammation and to induce of oxidative stress **(1,2-4).** Peroxinitrite (ONOO) is generated locally in inflammation focus as result of the interaction of $O_2^{\cdot-}$ generated by NADPH-oxidase and NO formed by inducible NO-synthase of neutrophil, monocytes and other cells **(5-7)**. The development of the number of diseases is shown to couple with NO, ROS and neutrophils**,** therefore the research of processes of these elements interaction with each other and their regulation are actual problems.

The aim of our study was to investigate the lidocaine and ONOO influence on neutrophil activity *in vitro* for the cases of separate and combined action of these substances.

The work carried out using methods of chemiluminescence, light microscopy, atomic force microscopy, and spectrophotometry according to protocols described in articles **(7,8).** We revealed that ONOO in concentration $0.7\cdot10^{-5}$-$1.2\cdot10^{-4}$ M regulates the neutrophil activity. ONOO leads to the increase of ROS generation by cells activated during adhesion and under action of chemotaxis agent fMLP, accelerates the neutrophil degranulation and myeloperoxidase (MPO) secretion outside the cells, induces the substrates nitration both in the presence and in the absence of peroxidases, including protein NETs). It is tyrosine nitration, induces the significant neutrophil morphology changes and formation of neutrophil extracellular traps (necessary to note that NETs formed from neutrophil DNA and proteins rejected into extracellular medium can participate in cell and tissue destruction in inflammation focus, and here neutrophils can survive **(9).** It was found that lidocaine in concentration 0.2-$2\cdot10^{-3}$ M which compatible with amounted at traditional therapy leads to the decrease of ROS generation by neutrophils activated during adhesion, inhibits the oxidation of substrates by peroxidases and suppresses the neutrophil MPO secretion at adhesion and fMLP action. Under combined action of ONOO and lidocaine antagonism takes place. Lidocaine inhibits ONOO-induced increase of neutrophil ROS generation processes, substrates nitration in peroxidase systems, MPO secretion, NET formation. The lidocaine effects can be particularly explained by direct interaction lidocaine with ONOO which result to the ONOO cleavage.

The obtained findings testify to ONOO is able to serve as amplificator of neutrophil activity and stimulate both infectious microorganisms destruction and progression of inflammation disease including cardioatherosclerosis. Lidokaine can further to protection of host-organism tissues suppressing neutrophil activation and ONOO effects.

The work has supported by BRFFI grant (project B09-020).

References:

1. *M.W. Hollmann, E.D. Durieux* // Local anesthetics and Inflammatory response -Anesthesiology, 2000, v.93, N5, p.858-875.
2. *M. Häger, J. Cowland, N. Borregaard* // Neutrophil granules in health ***and*** disease - J.Intern.Med, 2010, v.268, N1, p.25-34.
3. *A.I. Kavalenka, E.V Kovsh, G.N. Semenkova, I.E. Adzeriho, S.N. Cherenkevich.* // Alteration of phagocytic and humoral immunity rates in patients with exertional angina pectoris functional class III at progressively worse of disease – News Biomed. Sci., 2011, v.3, N1, p. 45-51.
4. *B.M. Babior* // NADPH oxidase. - Curr. Opin. Immunol, 2004, v.16, N1, p. 42–47.
5. *M.N. Starodubtseva, A.I. Kavalenka, D.R. Petrenyov, S.N. Cherenkevich.* // Effects of peroxynitrite on morphology and functions of neutrophils - “Handbook of free radicals: formation, types and effects” Eds.: D. Kozyrev, V. Slutsky. Series: Cell Biology Research Progress. Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, Inc., 2010, p. 479-503.
6. *S. Baldus, T. Heitzer, J.P. Eiserich.* // Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion - Free Radic. Biol. Med., 2004, v.37(6), p. 902-911.
7. *M.N. Starodubtseva, A.I. Kavalenka, N.I. Egorenkov, D.R. Petrenyov, S.N. Cherenkevich.* // Peroxynitrite regulates exocytosis neutrophil granules - Biol. Membranes, 2010, v. 27, N6, p. 459-470.
8. *A.I. Kavalenka, G.N. Semenkova, S.N. Cherenkevich.* // Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro - Cell Tissue Biology, 2007, v.1, N6, p. 551-559.
9. *F. Wartha, K. Beiter, S. Normark, B.* Henriques-Normark. // Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis – Curr. Opin. Microbiol., 2007, v.10, (1), p. 52-56.

АНТИОКСИДАНТНАЯ БИОМЕДИЦИНА: ОТ ХИМИИ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ К СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ

Кольтовер В.К.

Институт проблем химической физики Российской академии наук, Черноголовка, Россия
e-mail: koltover@icp.ac.ru

Антиоксидантами в современной биомедицинской литературе называют весьма широкий класс соединений, синтетических и природных, которые имеют в своих молекулах фенольное или полифенольное кольцо с гидрокси- или оксигруппой и способны ингибировать стандартную цепную реакцию окисления, например, автоокисление линоленовой кислоты. Природные и синтетические антиоксиданты уже давно и широко применяются в пищевой промышленности и в медицине. При правильном подборе дозы такие соединения повышают надежность защиты клеток и тканей от химически активных форм кислорода. Например, антиоксидант 4-метил-2,6-дитретбутилфенол (он же – «ионол» или «дибунол», в зарубежной литературе – «butylated hydroxytoluene», BHT) применяется для лечения ожогов, огнестрельных ранений, трофических язв, рака мочевого пузыря. Водорастворимый антиоксидант 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин-сукцинат («мексидол») применяется для лечения нарушений мозгового кровообращения, а гидрохлорид того же соединения («эмоксипин») – в офтальмологии [1]. Те же синтетические антиоксиданты оказались эффективными геропротекторами, т.е. веществами, увеличивающими продолжительность жизни лабораторных животных при регулярном добавлении к пище или питьевой воде [2, 3].

Однако результаты анализа констант скоростей и реальных концентраций антиоксидантов вызывают сомнения в том, что *in vivo* эти соединения действуют столь же простым образом, как *in vitro*, т.е. в качестве ингибиторов свободнорадикальных процессов. Например, эффективность антиоксидантов как перехватчиков анион-радикала кислорода (супероксидный радикал, $O_2^{\bullet-}$) в клетках и тканях ничтожна мала по сравнению с эффективностью специализированного антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы (СОД). Гидроксильный радикал ($OH^{\bullet}$) реагирует с любыми органическими молекулами с константами скоростей, близкими к диффузионному пределу, и поэтому *in vivo* никакой антиоксидант не способен конкурировать за этот радикал с другими органическими молекулами, число которых в окружении радикала всегда существенно превышает число молекул антиоксиданта [4].

К настоящему времени накоплено достаточно много экспериментальных данных, позволяющих утверждать, что антиоксиданты действуют *in vivo* превентивным образом, предотвращая образование радикалов кислорода и/или продуктов свободнорадикального окисления. Например, дибунол предотвращает возникновение в митохондриях радикала $O_2^{\bullet-}$ как побочного продукта электронного транспорта [5]. Аналогичный профилактический «антиоксидантный» эффект способен обеспечить ядерный спин изотопа магния-25. Из трех стабильных изотопов магния, ^{24}Mg, ^{25}Mg и ^{26}Mg, природное соотношение которых 79, 10 и 11%, только ^{25}Mg является магнитным изотопом (имеет ядерный спин I = 5/2), тогда как ^{25}Mg и ^{26}Mg – немагнитные изотопы (ядерный спин I = 0). Обнаружено, что клетки *E. coli*, выращенные на магнитном изотопе ^{25}Mg, существенно быстрее адаптируются к новой среде, в частности, формируют вдвое больше колоний на агаре, чем клетки, выращенные на немагнитных изотопах ^{24}Mg или ^{26}Mg. Более того, клетки, выросшие на ^{25}Mg, характеризуются вдвое меньшим уровнем активности СОД по сравнению с клетками, выросшими на ^{24}Mg. Поскольку СОД - индуцибельный фермент, то факт пониженной его активности однозначно свидетельствует о пониженном уровне генерации $O_2^{\bullet-}$ [6].

Экспериментально доказано, что в профилактической антиоксидантной терапии важнейшую роль играет гипоталамо-гипофизарная система организма [7,8]. Открыты регуляторные белки, чувствительные к редокс-состоянию внутриклеточной среды, например, Sirt1, которые производят эпигенетические структурные изменения в хроматине с последующей активацией синтеза защитных белков, в том числе – антиоксидантных ферментов. Между тем, редокс-состояние зависит от соотношений восстановленного и окисленного компонента в парах типа GSH/GSSG, $NADPH/NADP^+$ и $NADH/NAD^+$, на которые, в свою очередь, могут влиять и радикалы $O_2^{\bullet-}$, и антиоксиданты. Таким образом, все больше экспериментальных данных свидетельствует о том, что механизмы антиоксидантной профилактики следует искать на путях развития системной биологии.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты № 10-03-01203а и 10-04-90408-Ukr_a).

Литература:

1. *Бурлакова Е.Б.* Биоантиоксиданты // Рос. хим. ж., 2007, т. 51, с. 3-12.
2. *Эмануэль Н.М., Липчина Л.П.* Лейкоз у мышей и особенности его развития при воздействии ингибиторов цепных окислительных процессов // Докл. АН СССР, 1958, т. 121, с.141-144.
3. *Harman D.* Aging: A theory based on free radicals and radiation chemistry. - J.Gerontol., 1956, v. 11, p. 298-300.
4. *Koltover V.K.* Free radical theory of aging: Quantitative reliability aspects and antioxidant intervention. - Vienna Aging Series, Vol.5: Vitality, Mortality and Aging (ed. A.Viidik and G.Hofecker), Vienna, 1996, p. 173-180.
5. *Koltover V.K.* Bioantioxidants: The systems reliability standpoint. - Toxicology and Industrial Health, 2009, v. 25, 295-299.
6. *Koltover V.K.* Nuclear spin catalysis in molecular liquids and biopolymer nano reactors. - Український фізичний журнал, 2011, т. 56 (in press).
7. *Frolkis V.V., Gorban E.N., Koltover V.K.* Effects of antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) on hormonal regulation and ESR signals in adult and old rats. - AGE, 1990, v. 13, p. 5-8.
8. *Goncharova N.D., Shmaliy A.V, Bogatyrenko T.N., Koltover V.K.* Correlation between the activity of antioxidant enzymes and circadian rhythms of corticosteroids in *Macaca mulatta* monkeys of different age. – Exp. Gerontol., 2006, v. 41, p. 778-783.

ANTIOXIDANT BIOMEDICINE: FROM CHEMISTRY OF FREE RADICALS TO SYSTEMS BIOLOGY

Koltover V.K.

Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russia
e-mail: koltover@icp.ac.ru

In modern biomedical literature, antioxidants represent mostly a broad class of phenolic compounds whose valence-saturated molecules intercept active free radicals thereby inhibiting free radical chain reactions, for example, oxidation of linolenic acid in model systems (*in vitro*). Some of them, both synthetic and natural, found wide use in food industry and medicine. With appropriate dosage, such the compounds increase reliability of defense of cells and tissues against reactive oxygen species. For example, antioxidant 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (called Ionol or Dibunol in Russian literature and butylated hydroxytoluene, BHT, in English-language literature) is used to treat burns, gun-shot wounds, trophic ulcers, and bladder cancer. The water-soluble Mexidol (2-ethyl-3-hydroxy-6-methylpyridine succinate) is used to treat brain circulation disorders while Emoxipine (hydrochloride of the same pyridine derivative) is used in ophthalmology **(1)**. The same synthetic antioxidants, BHT and Emoxipine, proved to be effective geroprotectors, *i.e.*, compounds that extend the life spans of laboratory animals when regularly added to food or drinking water **(2, 3)**.

However, the results of analysis of the rate constants and the actual concentrations of antioxidants in cells and tissues raise doubts in the fact that the antioxidants perform *in vivo* in as simple way as *in vitro*, *i.e.*, only as free-radical inhibitors. For example, the efficiency of the antioxidants to scavenge oxygen anion-radicals (superoxide radical, $O_2^{\bullet-}$) in cells and tissues is negligibly low when compared to the efficiency of the specialized antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD). The hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) is known to react with any organic molecules as a strong oxidant with the rate constants close to the diffusion limit. Therefore, *in vivo*, none of the antioxidants can compete for $OH^{\bullet}$ with other organic molecules, which are obviously always present around this radical in considerably greater numbers than the molecules of any antioxidant **(4)**.

Up to date there is enough amount of evidence that the antioxidants, being unable to effectively scavenge free radicals *in vivo*, can increase the systems reliability through the prophylactic maintenance against reactive forms of oxygen. Namely, some antioxidants can prevention generation of free radicals as by-products of oxidative metabolism while other antioxidants can upregulate synthesis of the antioxidant enzymes. The particular protection mechanisms seem to be different for antioxidants of different types. For example, BHT prevents generation of the $O_2^{\bullet-}$ radicals as the by-products of electron transport in the mitochondrial nanoreactors **(5)**.

A similar preventive “antioxidant” effect can be exerted by the nuclear spin of magnesium-25. Among three stable magnesium isotopes, ^{24}Mg, ^{25}Mg and ^{26}Mg with natural abundance 79, 10 and 11%, only ^{25}Mg has a nuclear spin (I = 5/2) and, therefore, it has the nuclear magnetic moment. Two other isotopes of magnesium are spinless (I = 0) and, hence, have no magnetic moment. We have revealed that the cells of *Escherichia coli*, which were grown on the magnetic ^{25}Mg, exhibit essentially faster adaptation abilities, in part, form twice as much colonies on agar by comparison with the cells which were grown on the nonmagnetic ^{24}Mg or ^{26}Mg. Moreover, the cells grown on the magnetic ^{25}Mg exhibit significantly less activity of SOD, the most important antioxidant enzyme, by 40 per cent, when compared to the cells grown on the nonmagnetic ^{24}Mg. Inasmuch as the level of SOD activity is adjusted to the intracellular level of $O_2^{\bullet-}$, the lower activity of SOD can be considered as evidence for the lower production of $O_2^{\bullet-}$ as the faulty by-product of respiration **(6)**.

It has been well documented that the beneficial effects of the antioxidant prophylaxis, including the capability of the antioxidants to increase the life-spans of laboratory animals, are mediated via the endocrine hormonal mechanisms, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the hypothalamic-pituitary-thyroid axis **(7, 8)**. Furthermore, the special regulatory proteins whose genes are sensitive to the changes in redox state of intracellular medium have been recently found in human and animal organisms. For example, Sirt1 produces the epigenetic structural changes in chromatin which activate synthesis of protective proteins, among them – the antioxidant enzymes. Meanwhile, the redox state is controlled by the couples like GSH/GSSG, $NADPH/NADP^+$ and $NADH/NAD^+$ in which the ratios of the reduced and oxidized components are dependent on the available concentrations of $O_2^{\bullet-}$ and antioxidants. Thus, more and more experimental results indicate that the molecular mechanisms of the "antioxidant prophylaxis" should be studied on the ways of systems biology.

Supported by Russian Foundation for Basic Research (projects # 10-03-01203a и 10-04-90408-Ukr_a).

References:

1. *Бурлакова Е.Б.* Биоантиоксиданты // Рос. хим. ж., 2007, т. 51, с. 3-12.
2. *Эмануэль Н.М., Липчина Л.П.* Лейкоз у мышей и особенности его развития при воздействии ингибиторов цепных окислительных процессов // Докл. АН СССР, 1958, т. 121, с.141-144.
3. *Harman D.* Aging: A theory based on free radicals and radiation chemistry. - J.Gerontol., 1956, v. 11, p. 298-300.
4. *Koltover V.K.* Free radical theory of aging: Quantitative reliability aspects and antioxidant intervention. - Vienna Aging Series, Vol.5: Vitality, Mortality and Aging (ed. A.Viidik and G.Hofecker), Vienna, 1996, p. 173-180.
5. *Koltover V.K.* Bioantioxidants: The systems reliability standpoint. - Toxicology and Industrial Health, 2009, v. 25, 295-299.
6. *Koltover V.K.* Nuclear spin catalysis in molecular liquids and biopolymer nano reactors. - Український фізичний журнал, 2011, т. 56 (in press).
7. *Frolkis V.V., Gorban E.N., Koltover V.K.* Effects of antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) on hormonal regulation and ESR signals in adult and old rats. - AGE, 1990, v. 13, p. 5-8.
8. *Goncharova N.D., Shmaliy A.V, Bogatyrenko T.N., Koltover V.K.* Correlation between the activity of antioxidant enzymes and circadian rhythms of corticosteroids in *Macaca mulatta* monkeys of different age. – Exp. Gerontol., 2006, v. 41, p. 778-783.

ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ФОРМ ХИТОЗАНА ПОЛИФРАКЦИОННОГО СОСТАВА В СОЧЕТАНИИ С ЭКСТРАКТАМИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

[1]Комаров Б.А., [2]Албулов А.И., [3]Трескунов К.А., [4]Погорельская Л.В.

[1]Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Россия, e-mail: komarov@chgnet.ru
[2]Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности РАСХН, Щелково, Россия, e-mail: bioprogress@mail.ru
[3]Больница НЦЧ РАН, Черноголовка, Россия
[4]Российская медицинская академия последипломного образования, Москва, Россия

Лиофилизация растворов хитозана полифракционного состава в присутствии L-глутаминовой кислоты (L-аргининовой или янтарной) в экстракте лекарственных растений в деминерализованной воде приводит к увеличению выхода сухих экстрактов растительного сырья на 5 – 10 мас % по сравнению с лиофилизацией водных экстрактов без добавок полисахарида. Увеличение выхода биологически активных веществ (БАВ) соответствует требованиям методических рекомендаций МЗ РФ по фитотерапии и обусловливает повышенный синергетический эффект применения получаемых препаратов – фитохитодезов.

Хитозан выполняет защитное действие от физико-химических повреждений БАВ при замораживании, высушивании и хранении. В процессе применения фитохитодезов хитозан пролонгирует действие лечебного начала лекарственных растений. Кроме того, фитотерапевтическое действие усиливается и дополняется положительным действием фракций хитозана.

Олигомерная фракция выполняет существенную иммунокоррегирующую роль, проявляющуюся на ранних этапах становления иммуногенеза: на этапе захвата антигена макрофагами, а также передачи антигенной информации В-лимфоцитам и активации клеток В-системы иммунитета.

Мономерное звено хитозана - глюкозамин – способствует восстановлению хрящевой ткани, что укрепляет суставы, облегчает движение и уменьшает боль, например, при артрозе.

Высокомолекулярная фракция хитозана пролонгирует действие лекарственных растений и их экстрактов и выполняет важную детоксицирующую функцию в желудочно-кишечном тракте. Особое место занимает фракция хитозана с ММ ≤ 50 кДа и степенью деацетилирования 75 – 80 %, которая при повышении pH среды до величин 7,0 – 7,3 не выделяется в отдельную фазу, а остается в виде коллоидных частиц, для которых характерны наноразмерность и высокое детоксицирующее действие. Кроме этого, высокомолекулярная фракция хитозана выполняет роль анионнообменной смолы, связывающей в кишечнике не только тяжелые металлы, бактериальные липополисахариды и другие токсины, но и желчные кислоты. Вывод их из организма приводит к усилению их синтеза из эндогенного холестерина, соответственно, к уменьшению его содержания в печени, в крови и ЛПНП в плазме.

На волонтерах и в эксперименте на животных достоверно показано, что хитозан способствует улучшению липидного обмена, нормализации белкового и витаминного обмена. Обнаружено также, что хитозан увеличивает адаптационные возможности организма на фоне ЛПС-индуцированной эндотоксемии и может быть успешно использован при лечении ряда инфекционных патологий.

Хитозан, активируя гиалуронидазу и β-глюкуронидазу, усиливает лимфодренаж, снимает отечность, улучшает солевой обмен и работу выделительных органов.

Полимерметаллокомплексы хитозана в зависимости от природы иона металла способны стимулировать (или угнетать с увеличением концентрации, например, ионов меди) пролиферацию клеток в тимусе, костном мозге и лимфатических узлах, а также увеличивать число эритроцитов и лейкоцитов в периферической крови. По существу происходит стимулирование активности органов кроветворения.

Попадая в кровь олигомеры хитозана оказываются и в печени, где образуются его комплексы с гепарином, которые обладают прежде всего антикоагулирующим действием, а также активируют ферменты, устраняют очаги воспаления и способствуют дезинтоксикации, регенерации и восстановлению работоспособности печени. Роль олигомеров хитозана этим не ограничивается.

Показано, что смесь мономера и димера хитозана с цитостатиками (циклофосфан и цисплатин) в небольших, неэффективных дозах увеличивают индекс ингибирования метастазов при LL-карциноме до 98 %. Можно полагать, что действующим началом в этом случае являются комплексы цитостатиков с олигомерами хитозана. При этом мономер и димер могут выполнять роль проводника цитостатиков, а избыточное их количество (или все формы?) – роль антиоксиданта. Существенно то, что для получения эффекта не потребовалось образовывать ковалентную связь и создавать «гибридную молекулу»! Подобный синергизм может реализоваться и в действии фитохитодезов, в которых совмещаются различные растворимые органические вещества и широкого спектра макро-, микро- и нано-элементы в легко усваиваемой форме с молекулами хитозана полифракционного состава.

Способы получения и применения фитохитодезов защищены 11 патентами России.

SYNTHESIS AND APPLICATION OF WATER-SOLUBLE FORMS OF CHITOSAN OF POLYFRACTIONAL COMPOSITION COMBINED WITH HERBAL EXTRACTS

[1]Komarov B.A., [2]Albulov A.I., [3]Treskunov K.A., [4]Pogorel'skaya L.V.

[1]Institute of Problems of Chemical Physics of RAS, Chernogolovka, Russia, e-mail: komarov@chgnet.ru
[2]All-Russia Research and Technological Institute of Biological Industry of RAAS, Shchelkovo, Russia, e-mail: bioprogress@mail.ru
[3]Hospital of NSC RAS, Chernogolovka, Russia
[4]Russian Medical Academy of Post-Diploma Education, Moscow, Russia

Lyophilization of chitosan solutions of polyfractional composition in the presence of L-glutamic acid (L-arginic or succinic acid) in a herbal extract in demineralized water increases the yield of dry extracts of plant raw materials by 5—10 wt % compared to the lyophilization of aqueous extracts without polysaccharise additives. An increase in the yield of biologically active substances (BAS) corresponds to the requirements of methodological recommendations of the Ministry of Health protection of the Russian Federation on phytotherapy and causes an enhanced synergetic effect of application of the obtained preparations — phytochitodeses.

Chitosan protects BAS from physicochemical damages on freezing, drying, and storage. During the use of phytochitodeses, chitosan prolongs the action of the curing origin of medical plants. In addition, the phytotherapeutic effect is enhanced and supplemented by the positive action of chitosan fractions.

The oligomeric fraction plays a substantial immune-correcting role appeared at earlier stages of immunogenesis formation: at the stage of capture of an antigen by macrophages and the transfer of antigen information by B-lymphocytes and activation of cells of the B-system of immunity.

The monomeric unit of chitosan (glucosamine) favors the reduction of cartilaginous tissue, which strengthens joints, facilitates motion, and decreases ache, for instance, during arthrosis.

The high-molecular-weight chitosan fraction prolongs the effect of medical plants and their extracts and performs an important detoxication function in gastrointestinal tract. A special role belongs to the chitosan fraction with MW ≤ 50 kD and the degree of acylation 75–80 %. This fraction is not isolated as a particular phase with an increase in the pH of the medium to 7.0–7.3 but remains as colloidal particles, which are characterized by the nanosize and high detoxication effect. In addition, the high-molecular fraction of chitosan acts as an anion-exchange resin, which in intestinal tract binds not only heavy metals, bacterial lipopolysaccharides, and other toxins but also bile acids. The removal of these substances from the organism enhances their synthesis from endogenic cholesterol and, correspondingly, decreases its content in liver and blood and the content of low-density lipopolysaccharide in plasma.

It was reliably shown for volunteers and in experiments with animals that chitosan improves lipid exchange and normalizes protein and vitamin exchange. It was also found that chitosan increases the adaptation possibility of the organism against the background of lipopolysaccharide-induced endotoxemia and can successfully be used when curing several infection pathologies.

Chitosan activates hyaluronidase and β-glucuronidase, enhances lymphodrainage, and improves the salt exchange and the work of excretory organs.

Depending on the metal ion nature, polymer—metal complexes of chitosans can stimulate (or depress with an increase in the concentration of, *e.g.*, copper ions) cell proliferation in thymus, marrow, and glands and increase the number of erythrocytes and leucocytes in peripheral blood. In essence, the activity of haemopoiesis organs is stimulated.

Getting into the blood, chitosan oligomers find themselves also in the liver, where its complexes with heparin are formed. These complexes possess, first of all, the anticoagulation effect and also activate enzymes, eliminate inflammation centers, and favor liver deintoxication, regeneration, and recovery of the working ability. The role of chitosan oligomers is not restricted by these functions.

It is shown that a mixture of chitosan monomer and dimer with cytostatics (cyclophosphane and cisplatin) in small, inefficient doses increases the inhibition index of metastases during LL-carcinoma up to 98%. It can be assumed that in this case the acting principle is presented by cytostatic complexes with chitosan oligomers. In this case, the monomer and dimer can act as a carrier of cytostatics, and their excessive amount (or all forms?) acts as an antioxidant. It is substantial that no formation of the covalent bond and no formation of a "hybrid molecule" were necessary to obtain the effect! Similar synergism can also take place in the action of phytochitodeses combining various organic substances and macro-, micro-, and nanoelements of a wide range in the easily assimilated form with chitosan molecules of polyfractional composition.

The methods of synthesis and application of the phytochitodeses were patented by 11 RF patents.

ВПЛИВ ОЦТОВОКИСЛОГО ЦИНКУ НА АКТИВНІСТЬ ІНТЕРФЕРОН-ІНДУКОВАНОГО ФЕРМЕНТУ 2′,5′-ОЛІГОАДЕНІЛАТ-СИНТЕТАЗИ В ЛІМФОЦИТАХ СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

Компанець І.В., Чайка В.О., Остапченко Л.І.

Навчально-науковий центр "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна e-mail: ir_kom@ukr.net

Проблема вивчення дії етанолу на біохімічні процеси в організмі є надзвичайно актуальною. При формуванні алкогольної залежності в організмі відбуваються глибокі й необоротні зміни клітинного метаболізму. Особливо важливим є пошук препаратів, котрі могли би використовуватися як засоби корекції метаболічних порушень, що виникають в результаті дії алкоголю. Відомо, що хронічна алкогольна інтоксикація супроводжується дефіцитом цинку в організмі. Серед солей цинку, що зазвичай використовуються, найменшу токсичність має оцтовокислий цинк. Тому актуально дослідити вплив цієї сполуки на біохімічні процеси в клітинах з метою її використання як протиалкогольного засобу. Відомо, що імунна система найбільш підлягає уражуючій дії етанолу. Не з'ясовано роль системи інтерферону у реакції імунної системи на хронічне споживання алкоголю. Система інтерферону бере участь у противірусному та протипухлинному захисті, а також імунній активації.

Метою роботи було визначити активність ключового ферменту системи інтерферону (ІФН) - 2′,5′-олігоаденілат-синтетази (2′,5′-ОАС) у лімфоцитах селезінки щурів на фоні хронічної алкогольної інтоксикації та при введенні оцтовокислого цинку. Хронічну алкогольну інтоксикацію викликали пероральним введенням 40 %-го розчину етанолу з розрахунку 2 мл на 100 г маси тварини раз на добу протягом 21 доби (1 група). Щурам другої групи додатково вводили оцтовокислий цинк у дозі 0,2 г на 100 г маси тварини. Активність 2',5'-ОАС визначали в екстракті лімфоцитів селезінки спектрофотометричним методом за кількістю неорганічного пірофосфату.

Встановлено, що при введенні етанолу щурам упродовж 4-х і 7-ми діб активність 2′,5′-ОАС у спленоцитах зменшується на 72 % порівняно з контролем, на 11-ту і 16-ту добу вона починала зростати, але при цьому була на 40 % і 22 % нижчою за контроль (рис. 1). На 21-шу добу активність 2′,5′-ОАС різко зменшувалась і була мінімальною (на 80 % менша за контроль). Виявлено, що при введенні тваринам оцтовокислого цинку на 4-ту, 7-му і 11-ту добу активність 2′,5′-ОАС не змінювалась відносно групи тварин, яка споживала лише етанол, і була меншою за контроль. На 16-ту добу експерименту активність 2′,5′-ОАС збільшувалась на 63 % відносно групи тварин, яким не вводили оцтовокислий цинк, при цьому активність перевищувала контроль на 40 %. Через 21 добу введення алкоголю активності ферменту зростала у 3,5 рази відносно групи щурів, яка не отримувала препарат цинку.

Виявлене нами зниження активності 2′,5′-ОАС може бути результатом змін біосинтезу ферменту в клітині або порушення його структури, що знижує здатність його щодо утворення комплексів з регуляторами, наприклад, дсРНК. При тривалому введенні ((протягом 21 доби) оцтовокислий цинк виявляє тенденцію до нормалізації активності ферменту. Встановлене збільшення активності 2′,5′-ОАС при введенні цинку на фоні дії етанолу може бути результатом стабілізації структури ферменту під впливом іонів Zn^{2+}, внаслідок чого він набуває здатності проявляти каталітичну активність. Отримані нами дані дозволяють розглядати оцтовокислий цинк як потенційний протиалкогольний засіб, який є ефективним при тривалій дії етанолу.

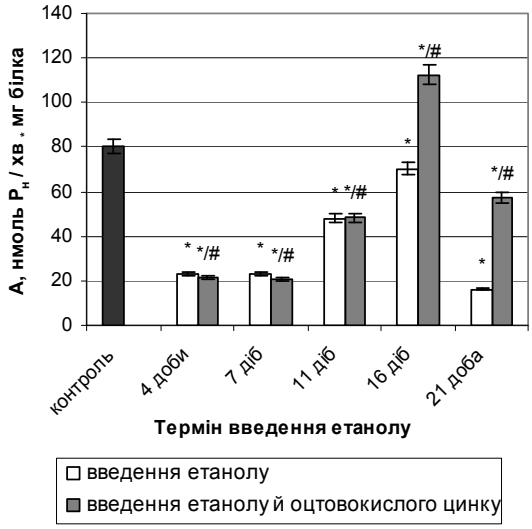


Рис. 1. Активність 2′,5′-олігоаденілат-синтетази (А, нмоль $P_н$ / хв · мг білка) в лімфоцитах селезінки щурів при 21-денному введенні етанолу та сумісно з препаратами оцтовокислого цинку

* – $P \leq 0,05$ відносно контролю (інтактні тварини);

\# – $P \leq 0,05$ відносно групи тварин, що отримувала лише етанол

THE INFLUENCE OF ACETIC ZINC ON INTERFERON-INDUCED ENZYME OLIGOADENYLATE-SYNTHETASE IN RAT SPLEEN LYMPHOCYTES IN CONDITIONS OF CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

Kompanets I.V., Chaika V.O., Ostapchenko L.I.

Educational and Scientific Centre "Institute of Biology"of Taras Shevchenko Kyiv University,
Kyiv, Ukraine
e-mail: ir_kom@ukr.net

The investigation of ethanol action on biochemical processes in organism is very urgent. The search of new antialcoholic preparations is especially important. Such preparations might be used to correct metabolic disturbances, which develop consequently to the alcohol action. It was shown that chronic alcohol intoxication is accompanied with zinc deficit in organism. The acetic zinc is the least toxic among the zinc salts. That's why is very actual to investigate the influence of this preparation on the biochemical processes in cells for the purpose of it's use as antialcoholic tool. The immune system is the sensitive to ethanol damaging action. The role of interferon system the reaction of immune system on chronic alcohol consumption isn't clarified yet. The interferon system takes part in antiviral and antiproliferative defence as well as immune activation.

The aim of this work is to determine the activity of interferon system key enzyme 2′,5′-oligoadenylate-synthetase (2′,5′-OAS) in rat spleen lymphocytes in conditions of chronical alcohol intoxication and at introduction of acetic zinc. The chronic alcohol intoxication was caused by peroral introduction of 40 % ethanol (2 ml per 100 g of mass) (the firs group). The rats of second group were injected of acetic zinc in a dose of 0.2 g per 100 g of mass. The activity of 2′,5′-oligoadenylate-synthetase were determined in lymphocyte extracts by the spectrofotometrical method.

It was shown that 2′,5′-OAS activity in splenocytes decreases on 72 % comparative to the control on 4-th and 7-th day of ethanol introduction (fig. 1). On 11-th and 16-th the activity began increase but was lower than control on 40% and 22%. On 21-th day of experiment the activity deeply decreased and was minimal (on 80 % less the control). It was observed that the introduction to animals of acetic zinc by 4, 7 and 11 days the 2′,5′-OAS activity didn't changed comparative to the group of animals that consumed ethanol only. On 16-th day of experiment the enzyme activity increased on 63 % but exceed the control on 40 %. On 21-th day of alcohol introduction the enzyme activity increased in 3.5 times comparative to the group of rats that weren't injected by zinc preparation.

The observed decrease of 2′,5′-OAS activity might be a result of changes of enzyme biosynthesis in cell or disruption of it's structure, that reduced the ability to form complexes with regulators such as dsRNA. At long term introduction (21 days) the acetic zinc display tendency to normalize the enzyme activity. The determined increase of 2′,5′-OAS activity at introduction of acetic zinc against a background of ethanol consumption might be a result of enzyme structure stabilization under the action of Zn^{2+} ions, that with the result that it displayed the catalytic activity. These results allow to consider the acetic zinc as potential antialcoholic tool that is effective at long term ethanol action.

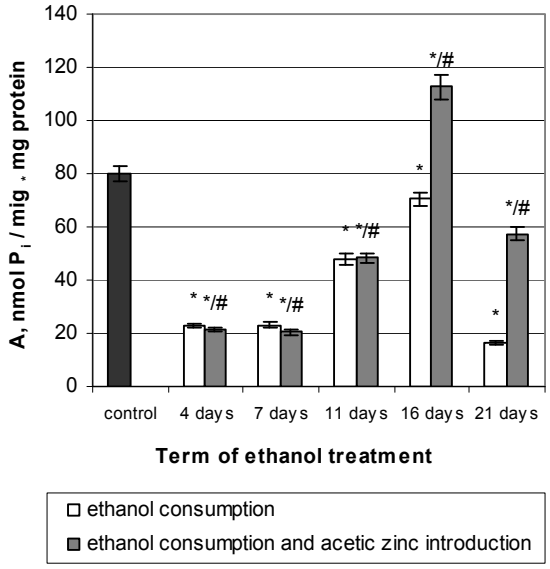


Fig. 1. The activity of 2′,5′-oligoadenylate synthetase (A, nmol P_i/min mg protein) in rat spleen lymphocytes at 21-th day ethanol consumption and injection of acetic zinc

* – P ≤ 0,05 comparative to the control (intact animals)

\# – P ≤ 0,05 comparative to the group of animals that consumed ethanol only

ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ КОМПОНЕНТНОГО СКЛАДУ СПЕРМИ ЧОЛОВІКІВ З РАДІОАКТИВНО ЗАБРУДНЕНИХ РЕГІОНІВ УКРАЇНИ

Кондратова Ю.А., Клепко А.В., Андрейченко С.В.

Науковий центр радіаційної медицини АМН України, Київ, Україна
e-mail:servadan@yahoo.com

Як відомо, сперма людини складається із сперматозоїдів та сім'яної рідини. Щоб мати запліднюючу здатність, сперма повинна містити морфологічно повноцінні і, одночасно, рухливі сперматозоїди з непошкодженим хроматином, а також відповідну концентрацію фруктози, аскорбату, L-карнітину, цитрату, простагландинів та цинку в сім'яній рідині. Всі вище перелічені компоненти сім'яної рідини мають не тільки фізіологічне, але й важливе діагностичне значення, оскільки на підставі їх кількісного визначення можна скласти уявлення про функціонування різних компартментів чоловічого репродуктивного тракту та допоміжних статевих залоз.

Більшість чоловічого населення України проживає в регіонах з радіоактивно-хімічним забрудненням. В таких умовах значно зростає ризик негативного впливу на чоловічу статеву систему, яка характеризується високою чутливістю до молекулярних та субклітинних пошкоджень, оскільки її клітини знаходяться в стані постійної проліферації та репродуктивного поділу, а самі сперматозоїди позбавлені ДНК-репараційного захисту.

Дослідження були проведені на 3 групах добровольців з Івано-Франківської, Житомирської та Київської областей. Збір сперми проводився шляхом мастурбацій у стерильні пластикові контейнери. Перед цим всі донори мали утримуватися від будь-яких статевих контактів щонайменше 3 дні. Слід відмітити, що у жодного з донорів не було помічено інфекції статевих шляхів. Після проведення розрідження зібраної сперми протягом 30 хв при кімнатній температурі, одну частину зразка використовували для мікроскопічного аналізу, що складався з визначення концентрації та загальної рухливості сперматозоїдів, а другу – для кількісних біохімічних вимірювань.

Параметри сперматозоїдів оцінювали за допомогою світлової мікроскопії на збільшенні ×500 під мікроскопом "МБИ-6" (Росія) відповідно до протоколу, запропонованого Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ). Концентрацію фруктози визначали спектрофотометрично за допомогою резорцину на спектрофотометрі "Specol -211" (Німеччина) при довжині хвилі 490 нм. Вміст цинку в сім'яній рідині досліджували з використанням атомно-абсорбційної спектроскопії на приладі "Analytik Jena Contr AA300" (Германія). Визначення L-карнітину та аскорбату проводилось за допомогою високоефективної рідинної хроматографії на приладі "Agilent 1200" (США), що був оснащений ультрафіолетовим детектором. Порівняння даних для різних груп донорів проводили із застосуванням дисперсійного аналізу "ANOVA" та непарного тесту Стьюдента з поправкою Бонферонi.

Проведені дослідження показали, що концентрація цинку мала найменше значення у чоловіків з Житомирської області, а найбільше – з Івано-Франківської. В Києві та Київській області вміст цинку в зразках був вищий ніж в Житомирській області, але порівняно зі зразками з Івано-Франківської області статистично достовірних відмінностей знайти не вдалося. Концентрація аскорбату в спермальній рідині суттєво відрізнялась для зразків з Житомирської області порівняно з Київською та Івано-Франківською, де цей показник більш ніж на 30% був менший. Вміст вільного L-карнітину в сім'яній плазмі виявився найбільшим для зразків з Івано-Франківської області, тоді як в Київському та Житомирському регіонах цей показник був відповідно на 27% та 37% нижчим. Для двох останніх регіонів статистично достовірних відмінностей знайдено не було. Концентрація фруктози в сім'яній плазмі за середніми значеннями була найбільшою в Житомирській області, а найменшою – в Івано-Франківській. Однак на статистичному рівні відмінностей тут встановлено не було.

Таким чином, в регіонах з підвищеним рівнем радіоактивного забруднення, зокрема Житомирській області, було встановлено пригнічення антиоксидантних, енергозабезпечуючих та хроматин-стабілізуючих властивостей сперми, що корелювало зі зменшенням вмісту аскорбату, вільного карнітину та цинку, відповідно, у сім'яній плазмі спермодонорів порівняно з регіонами з малою та помірною радіоактивною забрудненістю, а саме Івано-Франківським та Київським. Збільшення середньої накопиченої дози на населення регіону проживання спермодонорів прямим чином корелювало зі зростанням тенденцій до прояву астенозооспермії, олігозооспермії та збільшенням скорегованого фруктозного рівня в спермі. Проведені когортні дослідження показали, що зростання рівня радіоактивності в регіоні прямо позначається на якості сперми, оскільки призводить до накопичення морфологічних аномалій в сперматозоїдах, кількісних змінах в чисельності нерухомих та рухливих субпопуляцій сперматозоїдів, а також зменшенні об'єму еякуляту та загальної кількості сперматозоїдів.

DIAGNOSTIC RELEVANCE IN SPERM COMPOSITION IN MEN DONORS FROM RADIATION POLLUTED REGIONS OF UKRAINE

Kondratova Yu.A., Klepko A.V., Andreychenko S.V.

Scientific Center for Radiation Medicine of Academy of Medical Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail:servadan@yahoo.com

It is well known that human semen consists of sperm and semen fluid. To be qualified for fertilization semen must include morphologically normal and, simultaneously, motile spermatozoa with intact chromatin and the corresponding concentration of fructose, ascorbate, L-carnitine, citrate, prostaglandins and zinc in the seminal fluid. All the above mentioned components of semen fluid have not only a physiological, but also an important diagnostic value, because on the basis of their quantitative identification it would be possible to assess the performance of various male reproductive tract compartments and the functional status of secondary sex glands.

The majority of the male population of Ukraine lives in the regions with radioactive and chemical contamination. Under such conditions a risk of negative effects on male reproductive system greatly increases that may deal with high sensitivity of generative cells to molecular and subcellular damages because of their active proliferation and division. Furthermore, spermatozoa are deprived of DNA repair defense.

Studies were conducted on 3 groups of volunteers from Ivano-Frankivsk, Kyiv and Zhytomyr regions. Sperm was collected by masturbation in sterile plastic containers after 3 days of sexual abstinence. In all cases no genital tract infection was observed. After semen liquefaction for 30 min at room temperature, one part of the sample was used for microscopic analysis to determine the concentration and total sperm motility, and the second - for the quantitative biochemical measurements.

Sperm parameters were assessed by light microscopy at 500 magnification under the microscope "МБИ-6" (Russia) according to the protocol proposed by the World Health Organization (WHO). The concentration of fructose was determined by resorcinol on the spectrophotometer "Specol -211" (Germany) at a wavelength of 490 nm. The content of zinc in the seminal fluid was investigated using atomic absorption spectroscopy on the instrument “Analytik Jena Contr AA300” (Germany). Determination of L-carnitine and ascorbate was performed by high performance liquid chromatography on “Agilent 1200” (USA), which was equipped with an ultraviolet detector. Raw data analysis for different groups of donors was performed using "ANOVA" and unpaired Student test with correction of Bonferoni.

Studies showed that zinc concentration had the lowest value in men from Zhytomyr region, and the highest mean - from Ivano-Frankivsk. In Kiev and Kiev region zinc contents in the samples were higher than in Zhytomyr region, although no statistically significant differences with Ivano-Frankivsk were found. The concentration of ascorbate in seminal fluid significantly varied for samples from Zhytomir region compared with Kiev and Ivano-Frankivsk, where the means were more than 30% higher. The content of free L-carnitine in the seminal plasma was highest for samples from Ivano-Frankivsk region, while for Kiev and Zhytomir regions this index was on 27% and 37% lower, respectively. For the last two regions no statistically significant differences were found. The mean value of fructose concentration in the seminal plasma was the highestest in Zhytomyr region and the lowest - in Ivano-Frankivsk. However, no statistical differences were established.

Thus, in regions with high radioactive pollution, in particular Zhytomir region, inhibition of antioxidant, energy providing and chromatin-stabilizing properties of sperm was found that correlated with the decrease of ascorbate, free carnitine and zinc contents in semen plasma. Elevation of the average accumulated dose on the population of the region showed up direct correlation with increasing tendencies to display astenozoospermy, oligozoospermy and level of corrected fructose in sperm by donors. Cohort studies elucidated that the growth of radioactivity in the region affected sperm quality and caused the accumulation of morphological abnormalities in spermatozoa, quantitative changes in the number of fixed and mobile subpopulations of sperm cells, reduction of ejaculate volume and total sperm count.

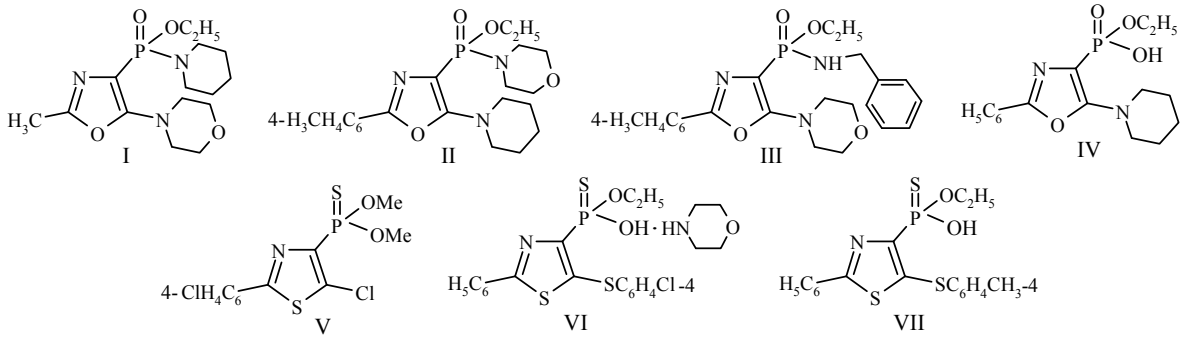
ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОТРОПНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ 4-ФОСФОРИЛЬОВАНИХ ПОХІДНИХ 1,3-ОКСАЗОЛУ ТА 1,3-ТІАЗОЛУ

Кондратюк К.М., Лукашук О.І., Метелиця Л.О., Головченко О.В., Попільніченко С.В., Прокопенко В.В., Мітюхін О.П., Броварець В.С.

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАНУ, Київ, Україна
e-mail: brovarets@bpci.kiev.ua

Наявність порушень імунної системи може бути причиною вторинного імунодефіциту та приводити до появи ускладнень при хронічних бактеріальних або вірусних захворюваннях. Важливу роль у вирішенні цієї проблеми відіграють препарати біологічної та хімічної природи, що виявляють імунотропну активність і у терапевтичних дозах поновлюють функції імунної системи. Саме до таких речовин, як показано нами, відносяться і 4-фосфорильовані похідні 1,3-оксазолу та 1,3-тіазолу **I-VII**, котрі зображені на схемі.

Дослідження проводились *in vivo*. В експерименті використовували нелінійних мишей самок, котрим вводили внутрішньочеревинно суспензію речовини у розрахунку $2\cdot10^{-4}$ моль на 1 кг маси тіла. Оцінювали імунотропну активність через 1 та 7 діб після введення сполук тваринам (таблиця).



Сполука	Тимус		Селезінка		Кількість фагоцитів на 100 ПМЯЛ	
	Кількість клітин на 1 г органу		Кількість клітин на 1 г органу			
	1 доба	7 діб	1 доба	7 діб	1 доба	7 діб
Контроль	27.1±1.5	28.7±2.0	18.2±1.4	18.2±0.6	59.3±3.3	61.6±4.0
I	42.9±1.9	23.0±1.4	21.4±1.8	20.3±1.4	54.8±2.5	62.0±2.9
II	36.3±1.6	35.7±2.6	19.4±1.2	18.3±1.0	57.7±2.0	59.9±5.3
III	34.6±0.7	29.2±1.7	20.3±1.3	22.9±1.1	56.0±3.1	63.5±4.8
IV	27.9±0.6	23.1±1.2	19.6±1.6	23.0±1.3	60.3±3.5	60.4±4.1
V	38.7±2.0	29.9±1.8	17.9±1.5	22.5±0.9	57.7±4.0	62.6±5.0
VI	33.4±2.6	29.2±2.0	18.9±1.1	22.2±1.0	56.9±3.3	63.2±4.4
VII	34.6±1.9	26.0±1.5	21.3±1.6	24.1±1.5	55.8±3.2	66.1±4.4

Представлені результати свідчать, що 4-фосфорильовані похідні 1,3-оксазолу та 1,3-тіазолу **I-VII** виявляють імунотропні властивості. Жодна із досліджених сполук не спричинила негативного, супресивного впливу на первинну відповідь імунної системи здорових мишей у зазначений термін дослідження. Крім того, сполуки **I-VII** стимулювали активність імунокомпетентних клітин тимуса і селезінки та антитілоутворюючої функції лімфоцитів крові піддослідних тварин. Тому виявлена короткотермінова імунотропна активність потребує подальшого вивчення ефектів 4-фосфорильованих похідних 1,3-оксазолу та 1,3-тіазолу на моделях імунокомпрометованих тварин з метою корекції вторинних, штучно викликаних, імунодефіцитних станів.

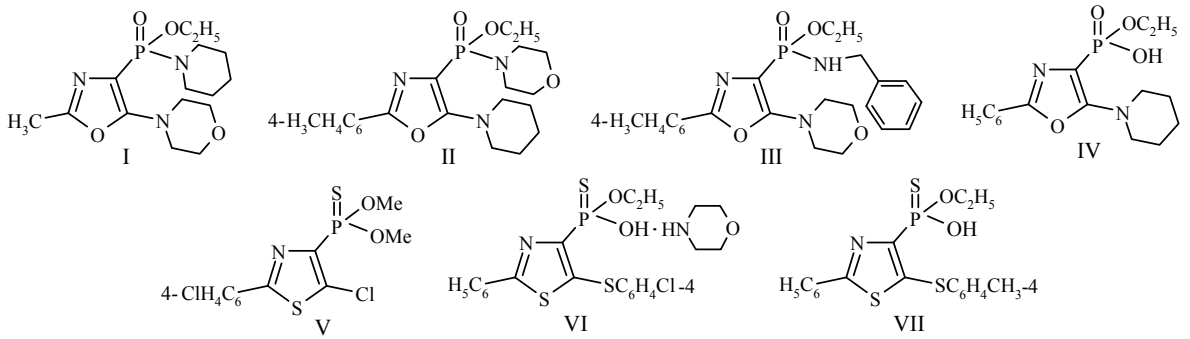
STUDY OF IMMUNOTROPIC PROPERTIES OF 4-PHOSPHORYLATED DERIVATIVES OF 1,3-OXAZOLE AND 1,3-THIAZOLE

Kondratyuk K.M., Lukashuk O.I., Metelitsa L.O., Golovchenko O.V., Popil'nichenko S.V., Prokopenko V.V., Mityukhin O.P., Brovarets V.S.

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry NAS Ukraine, Kiev
e-mail: brovarets@bpci.kiev.ua

Violations of the immune system can cause the second immunodeficiency and result in appearance of complications at chronic bacterial or viral diseases. Preparations of biological and chemical nature, which immunotropic activity is shown in therapeutic doses, restore functions of the immune system, and are important for solving this problem. We found that 4-phosphorylated derivatives of 1,3-oxazole and 1,3-thiazole **I-VII** represented on the chart are just this kind of compounds.

Research was carried out *in vivo*. In the experiment, nonlinear female mice were used to which suspension of a substanse in amount of $2 \cdot 10^{-4}$ mol on 1 kg of body mass was entered intraperitoneal. Immunotropic activity was estimates in 1 and 7 days after introduction of a substance (see the Table).



Substance	Thymus		Spleen		Amount of phagocytes on 100 PMNL	
	Amount of cells on 1g of organ		Amount of cells on 1g of organ			
	1 days	7 days	1 days	7 days	1 days	7 days
Control	27.1±1.5	28.7±2.0	18.2±1.4	18.2±0.6	59.3±3.3	61.6±4.0
I	42.9±1.9	23.0±1.4	21.4±1.8	20.3±1.4	54.8±2.5	62.0±2.9
II	36.3±1.6	35.7±2.6	19.4±1.2	18.3±1.0	57.7±2.0	59.9±5.3
III	34.6±0.7	29.2±1.7	20.3±1.3	22.9±1.1	56.0±3.1	63.5±4.8
IV	27.9±0.6	23.1±1.2	19.6±1.6	23.0±1.3	60.3±3.5	60.4±4.1
V	38.7±2.0	29.9±1.8	17.9±1.5	22.5±0.9	57.7±4.0	62.6±5.0
VI	33.4±2.6	29.2±2.0	18.9±1.1	22.2±1.0	56.9±3.3	63.2±4.4
VII	34.6±1.9	26.0±1.5	21.3±1.6	24.1±1.5	55.8±3.2	66.1±4.4

The presented results testify that is 4-phosphorylated derivatives of 1,3-oxazole and 1,3-thiazole **I-VII** exhibit immunotropic properties. None of studied substances causes negative, suppressive influence the primary responce of the immune system of healthy mice in the mentioned terms of research. In addition, compounds of **I-VII** stimulate activity of immunocompetency cells of thymus and spleen as well as antibody-forming functions of lymphocytes of blood of experimental animals. This short-term immunotropic activity stimulates further study of effects of 4-phosphorylated derivatives of 1,3-oxazole and 1,3-thiazole on the modeling immunocompromated animals with the purpose of correction of the second artificially caused immunodeficient states.

ОЦІНКА БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЦИТРАТОВАНИХ НАНОЧАСТИНОК Cu, Zn, Fe, Mg В ДОСЛІДАХ IN VIVO TA IN VITRO

Короленко Т.К., Дмитруха Н.М., Лагутіна О.С.

ДУ «Інститут медицини праці АМН України», м. Київ, Україна,
e-mail: dmytrukha@ukr.net

Сьогодні нанотехнології і наноматеріали швидкими темпами входять у різні сфери діяльності людини. Препарати, які отримані на основі нанотехнологій, починають використовувати в медицині й ветеринарії, сільському господарстві, парфумерній та харчовій продукції. Широке впровадження наноматеріалів пов'язано з особливими фізико-хімічними властивостями наночастинок. Серед наноматеріалів, особлива увага приділяється біогенним металам (мікроелементам), які відіграють важливу роль в організмі людини, беруть участь практично в усіх видах обміну речовин, приймають участь у процесах кровотворення, росту, розмноження, диференціювання клітин, імунних та інших реакціях. Дефіцит мікроелементів веде до розвитку структурних і функціональних порушень в організмі. З урахуванням зазначеного, на сьогодні перспективним є застосування мікроелементів у вигляді наночастинок, які легко проникають через мембрани клітин і включаються в обмінні процеси [1, 2].

Застосування нанотехнологій та наноматеріалів відкриває перед людством не тільки нові перспективи, але й створює нові загрози. Відсутність ґрунтовних знань про можливу небезпеку наноматеріалів для здоров'я людини та навколишнього середовища обумовлює необхідність проведення відповідних медико-біологічних досліджень.

Метою роботи було визначення біологічної активності цитратованих наночастинок Cu, Zn, Fe, Mg.

Цитрати наночастинок металів були отримані за допомогою ерозійно-вибухової нанотехнології за методом Каплуненка-Косінова [3]. В дослідах in vivo досліджували їх місцево-подразнювальну, шкірно-резорбтивну дію (на кролях) та сенсибілізувальну активність (на мурчаках) згідно відповідних методичних рекомендацій [4]. Цитотоксичну дію препаратів вивчали відносно клітинної лінії А-549 (недрібноклітинний рак легень людини) в МТТ-тесті [5]. Денатуруючу активність цитратів металів по відношенню до альбуміну плазми крові людини визначали за показниками оптичної густини розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 405 нм [6].

У результаті проведених досліджень встановлено, що нанесення цитратованих наночастинок металів на непошкоджену і скарифіковану шкіру піддослідних тварин не викликало місцево-подразнювальної та шкірно-резорбтивної дії як за однократної, так і за повторних аплікацій. Було відмічено, що загоєння штучно нанесених ран на шкірі дослідних тварин перебігало значно швидше, ніж у контрольних. Отримані дані свідчать також про відсутність у досліджуваних препаратів контактної сенсибілізувальної дії. Проте встановлено, що високі концентрації цитратованих наночастинок металів викликали загибель 30 % клітин А-549 у культурі. Найбільшу цитотоксичну активність по відношенню до клітин А549 проявляв цитрат Cu. Інкубація альбуміну людини з концентрованими розчинами препаратів біогенних металів викликала порушення структури - денатурацію цього білка. Найбільша активність відносно альбуміну була відзначена для цитрату Fe, найменша - для цитратів Mg і Zn. Оскільки відомо, що метали, які надходять у кров вступають у тимчасовий зв'язок з альбуміном, можна припустити, що взаємодія цитратованих наночастинок металів з даним білком є регуляторним механізмом, який контролює вміст металів у плазмі.

Таким чином, отримані результати досліджень дозволяють дійти висновку, що цитратовані наночастинки біогенних металів (Cu, Zn, Fe, Mg) не спричиняли пошкоджуючу дію при нанесенні на шкіру та слизову оболонку ока піддослідних тварин. Цитотоксична та денатуруюча активність досліджуваних препаратів залежала від виду наночастинок металу та їх концентрації у інкубаційному середовищі. Отримані дані співпадають з даними інших дослідників, які показали, що токсичність наночастинок біогенних металів в десятки разів менше, ніж токсичність іонів цих металів, зокрема, міді в 7 разів, цинку в 30 разів, а заліза в 40 разів [7].

Література:

1. *Борисенко В., Толочко Н.* Наотехнологии: этапы развития / В. Борисенко, Н. Толочко // Наука и инновации. Научно-практический журнал – 2008- №12 (70) – С.53-58.
2. *Лысцов В.Н., Мураин Н.В.* Проблемы безопасности нанотехнологий. – М., МИФИ, 2007. – 70 с.
3. Патент України на корисну модель № 29856. Спосіб отримання аквахелатів нанометалів «Ерозійно-вибухова нанотехнологія отримання аквахелатів металів» // Косінов Н.В., Каплуненко В.Г. / МПК (2006): B01J 13/00, B82B 3/00. Опубл. 25.01.2008. бюл. № 2/2008.
4. Методические указания по оценке токсичности и опасности дезинфицирующих средств. – МУ 1.2.1105-02. – М., 2002. – 30 с.
5. *Borenfreund E.* Comparison of two in vitro cytotoxicity assays – the neutral red (NR) and tertezolium (MTT) tests / E. Borenfreund, H. Babich, N. Martin-Alguacil // Toxicol. In Vitro. – 1988. – Vol. 2, N. 1. – P. 1-6.
6. *Прокопенко В.В.* Чувствительность молекулярных, надмолекулярных и клеточных биообъектов к катионам тяжелых металлов / В.В. Прокопенко, Ю.Н. Набока, Л.А. Метелица [и др.] // Соврем. проблемы токсикол.–1999.–№3. – С. 18-21.
7. *Колесниченко А.В., Тимофеев М.В.,* Протопопова М.В. Токсичность наноматериалов – 5 лет исследований // Российские нанотехнологии. – 2008. – Том. 3, № 3-4.

ASSESSMENT OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF CITRATE Cu, Zn, Fe, Mg NANOPARTICLES IN VIVO AND IN VITRO EXPERIMENTS

Korolenko T.K., Dmytrukha N.M., Lagutina O.S.

State Institution "Institute for Occupational Health AMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine
e-mail: dmytrukha@ukr.net

Today nanotechnology and nanomaterials is take root in various field of human activity. In particular, preparations which obtained by nanotechnology are beginning to use in medicine and veterinary, agriculture, food and perfumery products. The broad aplication of nanomaterials are due to the special physical and chemical properties of nanoparticles. Among the nanomaterials the special care devote to nutrient metals (trace elements), which play an important role in the human body, participating in all kinds of metabolic processes, involved in blood formation, growth, reproduction, cell differentiation, immune and other reactions. Micronutrients deficiency leads to the development of structural and functional disorders in organism. In view of this, today the trace elements are applied in the form of nanoparticles, which easily penetrate cell membranes and e included in the metabolic and other processes [1, 2].

Application of nanotechnology and nanomaterials opens to mankind not only new opportunities but also creates new threats. Lack of fundamental knowledge about the dangers of nanomaterials to human health and the environment necessitates appropriate medical and biological research.

The aim of this work was the determined of the biological activity of biogenic metals nanoparticles Cu, Zn, Fe, Mg Citrate of metals nanoparticles were obtained using erosion-explosive nanotechnology method of Kaplunenko-Kosinov [3]. In the in vivo we studied the acute dermal toxicity, the local irritation and resorption effect (on rabbits), skin contact hypersensitivity (on guinea pigs) in accordance with relevant guidelines [4]. Cytotoxic effect of preparations was studied on cell line A-549 (human lung cancer) in the MTT-test [5]. Denaturating activity to human plasma albumin was determined in terms of optical density solution on the spectrophotometer at a wave length of 405 nm [6].

The obtained results show that citrate of biogenic metals had no irritating effect on rabbits skin and mucous membrane covering the eyes. It was noted that the healing of wounds artificially inflicted on the skin of experimental animals ran significantly faster than in control. The obtained data also demonstrate the absence of the dermal absorbtion and sensitizing effec of preparations. However the high concentrations of metal citrate nanoparticles caused the death of 30% A-549 cells in culture. The greatest cytotoxic activity against A549 cells showed citrate Cu. Incubation of human albumin with concentrated solutions of metals citrate nanoparticles caused a destruction of this protein. Most active in relation to albumin was noted for citrate Fe, smallest - for citrate Mg and Zn. As it is known that metals, which enter to the blood come into temporary contact with albumin, one can assume that the interaction between metal nanoparticles and this protein is a regulatory mechanism that controls the content of metals in the plasma [6].

Thus, the results of research lead to the conclusion that citrate of biogenic metals nanoparticles (Cu, Zn, Fe, Mg) did not cause adverse effects when applied on the skin and eye conjunctiva of the animals. Cytotoxic and denaturating activity of this preparations were depended of the metal nanoparticles and their concenration in the medium. These data coincide with findings of other researchers who showed that the toxicity of nanoparticles biogenic metals less than the toxicity of metal ions, particularly copper in 7 times, zinc in 30 times and iron in 40 times [7].

References:

1. *Борисенко В., Толочко Н.* Наотехнологии: этапы развития / В. Борисенко, Н. Толочко // Наука и инновации. Научно-практический журнал – 2008- №12 (70) – С.53-58.
2. *Лысцов В.Н., Мураин Н.В.* Проблемы безопасности нанотехнологий. – М., МИФИ, 2007. – 70 с.
3. Патент України на корисну модель № 29856. Спосіб отримання аквахелатів нанометалів «Ерозійно-вибухова нанотехнологія отримання аквахелатів металів» // Косінов Н.В., Каплуненко В.Г. / МПК (2006): B01J 13/00, B82B 3/00. Опубл. 25.01.2008. бюл. № 2/2008.
4. Методические указания по оценке токсичности и опасности дезинфицирующих средств. – МУ 1.2.1105-02. – М., 2002. – 30 с.
5. *Borenfreund E.* Comparison of two in vitro cytotoxicity assays – the neutral red (NR) and tertezolium (MTT) tests / E. Borenfreund, H. Babich, N. Martin-Alguacil // Toxicol. In Vitro. – 1988. – Vol. 2, N. 1. – P. 1-6.
6. *Прокопенко В.В.* Чувствительность молекулярных, надмолекулярных и клеточных биообъектов к катионам тяжелых металлов / В.В. Прокопенко, Ю.Н. Набока, Л.А. Метелица [и др.] // Соврем. проблемы токсикол.–1999.–№3. – С. 18-21.
7. *Колесниченко А.В., Тимофеев М.В.,* Протопопова М.В. Токсичность наноматериалов – 5 лет исследований // Российские нанотехнологии. – 2008. – Том. 3, № 3-4.

ПОРІВНЯННЯ ВПЛИВУ ПІРИМІФОСМЕТИЛУ ТА ДІАЗИНОНУ НА СИЛОВУ ПРОДУКТИВНІСТЬ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ

Корчинська Л.В., Ноздренко Д. М., Макарчук М.Ю.

Київський національній університет імені Тараса Шевченка, ННЦ "Інститут Біології", Київ, Україна
e-mail: ddd@univ.kiev.ua

Використання фосфорорганічних інсектицидів є невід'ємною частиною сучасного сільського господарства. Їх широке застосування в аграрній промисловості призводить до зростання кількості випадків гострого та хронічного отруєння даними сполуками [1, 2]. Основним механізмом токсичної дії фосфорорганічних інсектицидів на функціонування скелетних мязів вважається пригнічення активності ацетилхолінестерази [3]. Проте, такі фосфорвмісні інсектициди як фосфоротіоати є непрямими інгібіторами даного ферменту, тобто потребують попередньої активації шляхом окиснення в оксоформу в організмі [4]. Прикладами фосфортіоатів є такі речовини як піримiфосметил та діазинон. Дослідження зміни динамічних параметрів скорочення при безпосередній дії на м'яз певних концентрацій діазинону та піримiфосметилу є необхідною умовою для порівняння їх міотоксичних властивостей.

Дію піримiфосметилу та діазинону на скоротливу активність скелетних м'язів вивчали у концентраціях 10^{-6}, $2{,}5\cdot10^{-6}$ та $5\cdot10^{-6}$ моль/л.

Дослідження проводили на пучках волокон м'язу m.tibialis anterior жаби *Rana temporaria*. Стимуляцію здійснювали прямокутними імпульсами частотою 30 Гц та тривалістю 3000 мс.

Діазинон в концентраціях 10^{-6}, $2{,}5\cdot10^{-6}$, $5\cdot10^{-6}$ моль/л зумовлював зниження силової продуктивності м'язу порівняно з контролем на 15,9% , 36% та 40,4% відповідно. При дії діазинону у концентрації $5\cdot10^{-6}$ моль/л рівень сили, яку м'яз розвивав на початковому етапі скорочення, стрімко знижувався при подальшій тривалості стимуляційного сигналу до нового, меншого за значенням, рівня (рис. 1).

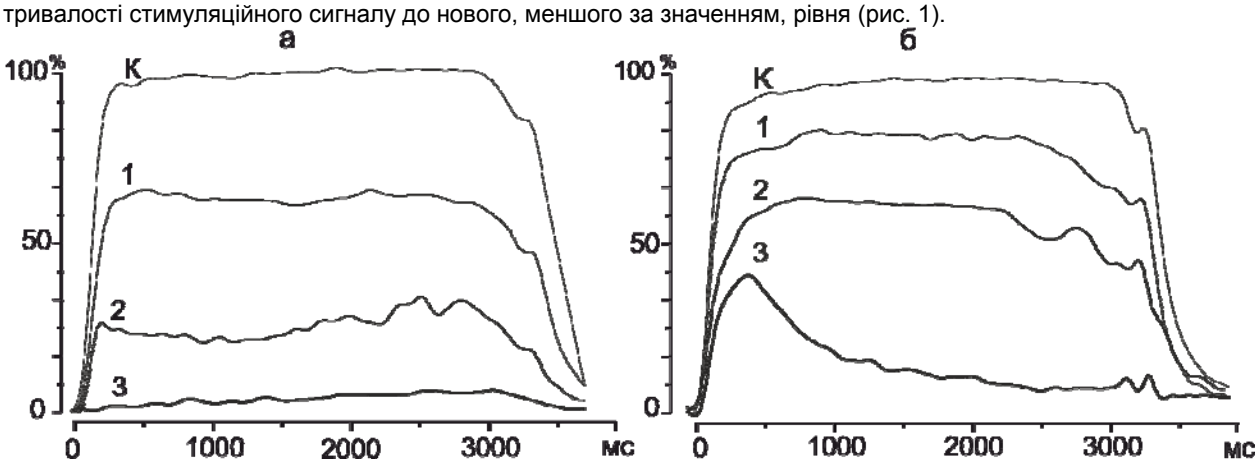


Рис. 1. Зміна силової продуктивності скелетного м'язу під дією фосфорорганічних інсектицидів у концентраційному діапазоні 10^{-6} - $5\cdot10^{-6}$ моль/л. а – піримiфосметилу; б – діазинону; К – контроль; 1- 3 – концентрації інсектицидів: 10^{-6}, $2{,}5\cdot10^{-6}$, $5\cdot10^{-6}$ моль/л відповідно.

Вплив піримiфосметилу в концентрації 10^{-6} та $2{,}5\cdot10^{-6}$ моль/л викликав зниження рівня генерації сили м'язом на 34,7% та 73% відповідно, що в 2 рази первищує значення отримані при дії діазинону. В рузультаті дії піримiфосметилу у концентрації $5\cdot10^{-6}$ моль/л відбувалося майже повне пригнічення силової продуктивності скелетного м'язу.

Отже, при безпосередній дії на скелетні м'язи таких фосфорорганічних інсектицидів як, піримiфосметил та діазинон відбувається пригнічення їх скоротливої активності. Причому, вплив даних фосфорорганічних інсектицидів на динамічні параметри скорочення характеризується вираженою концентраційною залежністю. Токсичний вплив піримiфосметилу на функціонування скелетних м'язів має більш виражений характер порівняно з діазиноном.

Література:

1. *Kwong K.* Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology //Ther Drug Monit. – 2002. – Vol.24. –P.144 – 149.
2. *Lotti M.* Low-level exposures to organophosphorous esters and peripheral nerve function //Muscle Nerve. -2002. –Vol.25. – P. 492 – 504.
3. *Karalliede L., Henry J.A.* Effect of organophosphates on skeletal muscle// Hum ExpToxicol. – 1993. – Vol.12. - P.289-296.
4. *Balali-Mood M., Balali-Mood K.* Neurotoxic disorders of organophosphorus compounds and their managements //Arch Iranian Med. – 2008. – Vol. 11, №1. - P. 65 – 89.

THE COMPARISON OF THE INFLUENCE OF PIRIMIPHOS-METHYL AND DIAZINON ON SKELETAL MUSCLE FORCE PRODUCTION

Korchynska L., Nozdrenko D., Makarchuk M.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Centre "Institute of Biology", *Kyiv, Ukraine.*
e-mail: ddd@univ.kiev.ua

Organophosphorus insecticides is an integral part of modern agriculture. The wide usage of these compounds in agriculture leads to increase of cases number of acute and chronic poisoning [1, 2]. The main mechanism of toxic effect of ordanophosphorus insecticides on skeletal muscle functioning is the inhibition of acetylcholinesterase [3]. However, such organophosphates as phosphorothioate are indirect inhibitors of this enzyme and need previous activation by means of it oxidation in oxidated form in organism [4]. Examples of phosphorthioate are such compounds as pirimiphosmethyl and diazinon. The investigation of the dynamical parameters of contraction under direct influence on muscle of different diazinon and pirimiphosmethyl concentrations is necessary condition for comparison their miotoxic effects.

The effect of diazinon and pirimiphosmethyl on skeletal muscle contraction activity was estimated in concentrations 10^{-6}, $2{,}5\cdot10^{-6}$ and $5\cdot10^{-6}$ mol/l.

The experiments were carried out on single skeletal fiber from *Rana temporaria* m.tibialis anterior muscle. The stimulation was carried out by means of rectangular stimulus **(**frequency – 30Hz, duration – 3000ms) using platinum electrodes.

Diazinon in concentrations 10^{-6}, $2{,}5\cdot10^{-6}$ and $5\cdot10^{-6}$ mol/l resulted in muscle force generation decrease by 15,9, 36 and 40,4 per cent respectively. Under influence of diazinon in concentration $5\cdot10^{-6}$ mol/l the force level generating by muscle at early stages of contraction rapidly reduced during further lasting of stimulation signal to new low magnitude level (Fig. 1).

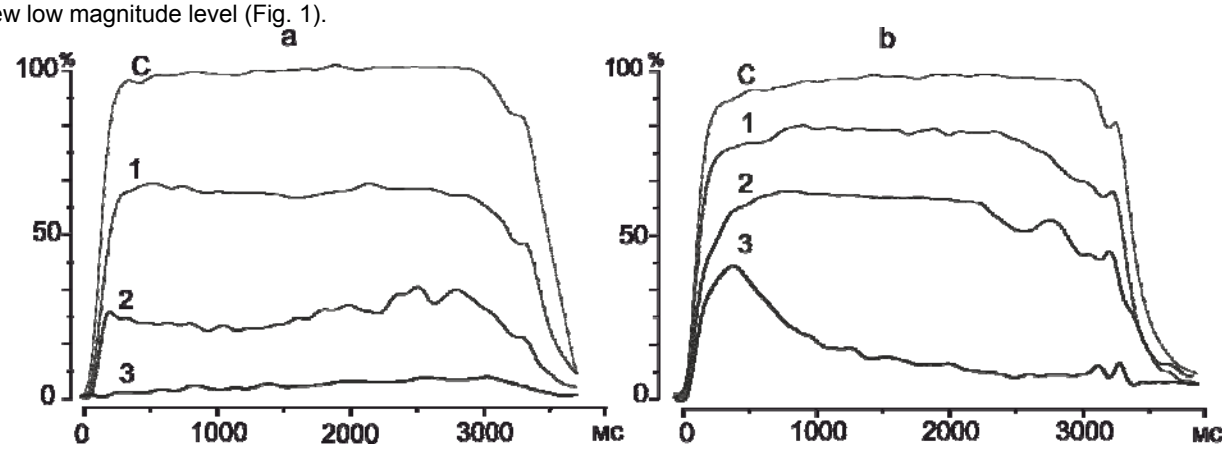


Fig.1. The change of skeletal muscle force generation under influence of organophosphorus insecticides in concentrations range 10^{-6} - $5\cdot10^{-6}$ mol/l. a – pirimiphosmethyl; b – diazinon; C - control; 1-3 – concentrations of insecticides 10^{-6}, $2{,}5\cdot10^{-6}$, $5\cdot10^{-6}$ mol/l respectively.

The influence of pirimiphosmethyl in concentration 10^{-6} and $2{,}5\cdot10^{-6}$ mol/l led to decrease of the level of muscle force generation by 34,7% and 73% respectively that is twofold higher than under influence of diazinon. Almost full reduction of skeletal muscle force production took place as a result of influence of pirimiphosmethyl in concentration $5\cdot10^{-6}$ mol/l.

Thus, the decline of muscle contraction activity occurred under direct effect of such organophosphorus insecticides as pirimiphosmethyl and diazinon. Furthermore, the influence of these organophosphorus insecticides on contraction dynamical parameters is characterized by concentration dependence. Toxic effect of pirimiphosmethyl on skeletal muscle functioning is more expressed than toxic effect of diazinon.

References:

1. *Kwong K.* Organophosphate pesticides biochemistry and clinical toxicology//Ther Drug Monit. – 2002. – Vol.24. –P.144 – 149.
2. *Lotti M.* Low-level exposures to organophosphorous esters and peripheral nerve function. //Muscle Nerve. -2002. –Vol.25. – P. 492 – 504.
3. *Forget G.* Pesticides and the third world //J Toxicol Environ Health.- 1991. –Vol. 32. – P. 11 – 31. 4.
4. *Balali-Mood M., Balali-Mood K.* Neurotoxic disorders of organophosphorus compounds and their managements //Arch Iranian Med. – 2008. – Vol. 11, №1. - P. 65 – 89.

КОНЦЕНТРАЦІЙНО-ЗАЛЕЖНЕ ПРИГНІЧЕННЯ СКОРОЧЕННЯ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ЖАБИ ПІД ВПЛИВОМ ДІАЗИНОНУ

Корчинська Л.В., Ноздренко Д.М., Мірошниченко М.С.

Київський національній університет імені Тараса Шевченка, ННЦ "Інститут Біології" Київ, Україна
e-mail: lesyal9@ukr.net

Пестициди є одним з постійнодіючих факторів екологічного забруднення. Насичення довкілля потенційно-небезпечними токсичними речовинами, в тому числі і пестицидами, призводить до зростання числа патологій, які зумовлені їх впливом. Фосфорорганічні сполуки, завдяки своїй високій ефективності в боротьбі з різними видами комах та порівняно низькій стійкості в довкіллі, складають вагому частину пестицидів, які застосовуються у веденні сучасного сільського господарства. На сьогодні в якості інсектицидних препаратів застосовується більш ніж 100 різних фосфорорганічних сполук, одним з яких є діазинон. Наразі, досі не існує одностайних поглядів щодо впливу фосфорорганічних інсектицидів на функціонування скелетних м'язів.

Оцінку впливу діазинону на м'язове скорочення проводили в концентрації $1 \cdot 10^{-5}$моль/л, оскільки, дія інсектициду у концентраціях, які перевищують обрану, зумовлювала майже повне пригнічення скоротливої активності м'язу.

Дослідження проводили на пучках волокон м'язу m.tibialis anterior жаби *Rana temporaria*. Стимуляцію прямокутними імпульсами частотою 30 Гц та тривалістю 3000 мс здійснювали за допомогою двох платинових електродів.

При використанні даної концентрації діазинону, поступове пригнічення силової продуктивності м'язу починалося з 9 хвилини проведення експерименту. Вже після 30 хвилини дії інсектициду рівень сили знижувався майже на 89% порівняно з контролем. Причому, на ділянках утримання сили вплив діазинону був більш вираженим ніж на ділянках її наростання. Підвищення частоти стимуляції супроводжувалося зниженням швидкості скорочення.

При дії діазинону встановлено лінійне часове зменшення ступеня зміни довжини м'язу при скороченні. Причому, зміна довжини м'язу не відбувалася вже після 10 хвилин впливу досліджуваного інсектициду. Тобто, сила, яка розвивається м'язом за таких умов є недостатньою для того, щоб подолати прикладене навантаження, що призводить до зміни режиму скорочення з ізотонічного в ізометричний.

В силовій відповіді активного м'яза при дії діазинону беруть участь складні нестаціонарні та концентраційно-залежні нелінійні процеси. При цьому змінюються динамічні параметри скорочення м'язових волокон.

Таким чином, аналіз отриманих даних показав, що під дією діазинону відбувається лінійне зменшення довжини, яке супроводжується нелінійними змінами силової продуктивності м'язу при скороченні. Інсектицид по-різному діє на тетанічний та дотетанічний періоди скоротливого акту.

CONCENTRATION-DEPENDENT DECREASE OF FROG SKELETAL MUSCLE CONTRACTION UNDER INFLUENCE OF DIAZINON

Korchynska L., Nozdrenko D., Miroshnichenko M.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, ESC "Institute of Biology", Kyiv, Ukraine
e-mail: lesyal9@ukr.net

Pesticides are one of factors of ecological pollution acting continuously. Satiation of environment by toxic substances including pesticides lead to increase of number of pathologies caused by their influence. Organophosphorus compounds due to their high effectiveness of struggle with different species of insects and relatively low stability in environment are considerable part of pesticides used in agriculture. More than one hundred different organophosphorus compounds are used as insecticides up today, one of such pesticides is diazinon. Currently there are not coordinated outlooks on influence of organophosphorus insecticides on skeletal muscle function.

Influence of diazinon on muscle contraction was assessed in concentration $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l because insecticide impact in concentration higher than used caused almost full decrease of muscle contraction activity.

The experiments were done on single skeletal fiber from *Rana temporaria* m.tibialis anterior muscle. The stimulation was carried out by means of rectangular stimulus **(**frequency – 30Hz, duration – 3000ms) using platinum electrodes.

A gradual depression of force generation began from 9 minute of experiment duration under using such concentration of diazinon. The force level decreasing was almost 89 percent compared with control level after 30 minutes of pesticide effect. Furthermore influence of diazinon on force retention sections was more significant than on force growth sections. Increasing of stimulation frequency accompany with reduction of contraction velocity.

A time linear reduction of muscle length change during contraction under influence of pesticide was revealed. In addition after 10 minutes of influence duration the change of muscle length hasn't already observed. Consequently the force developed by muscle under such conditions isn't sufficient for overcoming external load that cause to change of isotonic type of contraction to isometric.

Concentration-dependent nonlinear processes participate in strength response of active muscle under influence of diazinon with change of dynamical parameters of contraction.

Thus analysis of results showed that linear decrease of muscle length change which accompany with nonlinear reduction of muscle force production during contraction take place under influence of diazinon. Insecticide effects differ on tetanic and pretetanic periods of contraction.

АНТИАГРЕГАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ *ECHINACEAE PURPUREA*

[1]Красненкова Т.П., [2]Иванов О.И., [2]Домаш В.И., [1]Кардаш О.Ф., [1]Афонин В.Ю., [1]Шилов В.В.

[1]Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
e-mail: cardiopharm@yandex.ru
[2]Государственное научное учреждение «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф.Купревича НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Препараты с антитромботическим действием являются лекарственными средствами номер 1 в первичной и вторичной профилактике сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). На уровне рекомендаций I класса обосновано применение ацетилсалициловой кислоты (аспирин) в качестве антиагреганта. С другой стороны широко назначаемым пероральным антикоагулянтом остается кумадин (варфарин). Однако данные препараты действуют на одно звено гемостаза, обладают рядом побочных эффектов. А в случае с кумадином одной из проблем его использования является узкое терапевтическое окно. В настоящий момент ведется поиск новых альтернативных средств, обладающих как антиагрегантной, так и антикоагулянтной активностью с высоким уровнем безопасности. В качестве многообещающих средств рассматриваются композиции, изготовленные на основе растительного сырья. В то же время препараты *Ginko Biloba*, диквертин не показали значительного антиагрегантного эффекта в клинической практике. Одним из наиболее применяемых в лечебных целях растением является *Echinaceae purpurea*, в качестве основной фармакологической эффективности которого рассматривается иммуномодулирующая активность. Ранее в экстрактах корневищ и листьев *Echinaceae purpurea,* а также в очищенном препарате была обнаружена ингибиторная активность в отношении трипсина и тромбина [1]. Исследования in vivo при внутривенном введении раствора *Echinaceae purpurea (EpI)* крысам линии Wistar показали антикоагулянтную активность, проявляющуюся в достоверном увеличении тромбинового времени и активированного частичного тромбинового времени (АЧТВ) [2]. В настоящей работе исследовано действие препарата ингибиторов трипсина/тромбина из корневищ *Echinaceae purpurea (EpI)* на показатели АДФ-индуцированной агрегации в обогащенной тромбоцитами плазме крови крыс линии Wistar. Препарат *EpI* вводился перорально крысам линии Wistar в дозах 170 и 510 мкг/кг массы тела. Забор крови осуществлялся из сонной артерии через 1 и 3 часа в пробирки с раствором цитрата натрия (1:9). Регистрация процесса агрегации, индуцированной АДФ (5мкМ), в обогащенной тромбоцитами плазме производилась на люмиагрегометре Хроно-Лог (США).

Установлено, что через 1 час при дозе 170 мкг/кг фаза инициации агрегационного процесса составляла 14±2 с (p=0,0004 по сравнению с контролем), при дозе 510 мкг/кг - 8±1,7 с (p=0,048 по сравнению с контролем), в контроле 10,7±1,2 с. Тангенс угла (tgα) наклона пологой части кривой, характеризующий скорость процесса агрегации, в группе с дозой 170 мкг/кг был снижен до 23±5,3 (p=0,007 по сравнению с контролем), в контрольной - 31±1,7. Через 3 часа у животных отмечено более выраженное ингибирование агрегационного процесса, а именно: в группе с дозой 170 мкг/кг tgα составлял 15,3±2,1, что достоверно отличалось от контрольной группы (p=0,006), а также от показания группы с дозой 510 мкг/кг – 10,3±0,6 (p=0,00001 по сравнению с группой 170 мкг/кг). Следует отметить, что показания tgα группы с дозой 510 мкг/кг статистически значимо отличаются от контрольной группы (p=0,00001). Скорость агрегации в обеих экспериментальных группах через 3 часа после введения препарата статистически значимо ниже, чем через 1 час (p=0,041 в группе с дозой 170 мкг/кг, p=0,0006 в группе с дозой 510 мкг/кг)

Таким образом, препарат ингибиторов трипсина/тромбина из корневищ *Echinaceae purpurea* при пероральном введении крысам линии Wistar в дозе 170 мкг/кг через 1 час, а также в дозах 170 и 510мкг/кг через 3 часа оказывает достоверное замедление скорости развития АДФ-индуцированного агрегационного процесса и в перспективе может рассматриваться как соединение растительного происхождения, обладающее антиагрегантными свойствами.

Литература

1. *Иванов, О.А.* Распространение белков-ингибиторов сериновых протеиназ среди различных видов семейства Compositae / О.А.Иванов, В.И. Домаш // Сб. Науч.трудов «Ботаника» / Ин-т экспериментальной ботаники им. В.Ф.Купревича НАН Беларуси. – Минск, 2009. – Вып. 37. – С.384-393.
2. *Иванов, О.А., Красненкова, Т.П., Афонин, В.Ю.* Антикоагулянтная активность ингибиторов протеиназ Echinacea purpurea / О.А. Иванов, Т.П. Красненкова, В.Ю. Афонин, В.И. Домаш/ Мат. межд. Научно-практ. конф. «Белорусские лекарства» – Минск, Беларусь. – 2010. – С.77-79.

THE ANTIAGGREGANT ACTIVITY OF PROTEINASE INHIBITORS FROM *ECHINACEAE PURPUREA*

[1]Krasnenkova T.P., [2] Ivanov O.A., [2]Domash V.I., [1]Kardash V.F., Afonin V.Y., [1]Shylau V.V.

[1]State Institute «Science-production Centre «Institute of Pharmacology and Biochemistry of the NAS of Belarus»
Minsk, Belorussia
e-mail: cardiopharm@yandex.ru
[2]Kuprevich Institute of Experimental Botany NAS of Belarus, Minsk, Belorussia

Antithrombotic drugs are the medical products number 1 in primary and secondary prevention of cardiovascular diseases (CCD). At I class level of recommendations use of acetylsalicylic acid (aspirin) as antiagregant is proved. On the other hand cumadin (warfarin) remains widely appointed anticoagulant. However these drugs act on one stage of a hemostasis, possess a number of side effects. Besides cumadin has the narrow therapeutic window. Search of the new alternative medicines possessing both antiaggregant and anticoagulant activity with a high level of safety is conducted. The compositions produced from plant raw material are considered as promising medicines. At the same time compositions prepared from *Ginko Biloba* and diquertin have not shown significant antiaggregant effect in a clinical practice.

One of the most applied plant in the medical purposes is *Echinaceae purpurea*, which one is considered immunomodulating activity as major pharmacological efficiency. Previously it has been found out significant in vitro inhibiting activity of *Echinaceae purpurea* rhizomes and leaves extracts, and also the purified preparation of inhibitors in the relation trypsin and thrombin [1]. Researches in vivo have demonstrated anticoagulant activity such as significant lengthening of thrombin time and APTT at intravenous introduction of solution *Echinaceae purpurea (EpI)* to rats Wistar [2].

The effect of the tripsin/trombin inhibitors preparation from rhizomes *Echinaceae purpurea (EpI)* on parameters of ADF-induced aggregation in platelet riched plasma (PRP) of Wistar rats blood is analysed in this investigation. Preparation *EpI* in doses 170 and 510 mcg/kg was introduced per os (p.o.) to rats. The blood was sampled from a carotid artery after 1 and 3 hours into tubes with a sodium citrate solution (9:1). Registration of the ADF-induced aggregation (ADF 5мкМ) in PRP was carried out on Lumi-Aggregometer Chrono-Log (USA).

It is found, that initiation phase of aggregation was 14±2 s (p = 0,0004 vs. control) at a dose of 170 mcg/kg, 8±1,7 s (p=0,048 vs. control) at a dose of 510 mkg/kg after 1 hour whereas this parameter in the control group was 10,7±1,2 s. The slope (tg α) of the curve describing aggregation rate was 23±5,3 (p=0,007 vs. control rate 31±1,7) in group with a dose 170 mcg/kg. More pronounced inhibition of aggregation was observed after 3 hours. Tgα was 15,3±2,1 (p=0,006 vs. control) at dose of 170 mkg/kg, 10,3±0,6 (p=0,00001 vs. control; p=0,00001 vs. group with 170 mcg/kg) at dose of 510 mkg/kg The rate of aggregation in both experimental groups after 3 hours after preparation introduction statistically significantly more low, than after 1 hour in group with a dose of 170 mkg/kg (p=0,041) and in group with a dose of 510 mkg/kg (p=0,0006).

Thus the tripsin/trombin inhibitors preparation from *Echinaceae purpurea (EpI)* rhizomes introducing p.o. to Wistar rats at dose of 170 mkg/kg after 1 hour, and at doses 170 and 510mkg/kg after 3 hours produces significant delay of ADF-induced aggregation rate and it will be allowed to consider that plant compound has antiaggregation effect.

References:

1. *Ivanov, O.A.* Distribution of proteins-inhibitors of serine proteinases among differen species of family Compositae / O.A. Ivanov, V.I. Domash // Col. Scie.studies «Botanica»/ Kuprevich Institute of Experimental Botany NAS of Belarus. – Minsk, 2009. – Iss.37. – P.384-393.
2. *Ivanov, O.A., Krasnenkova, T.P., Afonin V.Y.* Anticoagulating activity of proteinase inhibitors from *Echinaceae purpurea* / O. A.Ivanov, T.P.Krasnenkova, V.Y. Afonin, V.I. Domash/ Mat. Int. Theor.- Pract. Conf. «Byelorussian medicines» – Minsk, Belarus. – 2010. – P.77-79.

ЛЮТЕОЛИН КАК ПРИРОДНЫЙ КОРРЕКТОР ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ОРГАНИЗМЕ

Кривошапко О.Н., Попов А. М.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток, Россия
e-mail: popovam@piboc.dvo.ru

Природный флавон лютеолин имеет широкое распространение в различных высших растениях и обладает разнообразной медико-биологической активностью. Наши исследования на экспериментальной модели аллоксанового диабета и недавние исследования зарубежных авторов показали, что при применении лютеолина наблюдается выраженный лечебно-профилактический эффект в отношении патологических нарушений, обусловленных развитием метаболического синдрома. На основании полученных результатов и анализа литературных данных представлены предполагаемые механизмы действия лютеолина. На базе этого вещества предполагается создание новых биологически активных добавок и лекарственных средств.

PROTECTIVE PROPERTIES OF LUTEOLIN AT DISTURBANCES OF THE CARBOHYDRATE AND LIPIDE EXCHANGE

Krivoshapko O. N., Popov A.M.

Pacific institute of bioorganic chemistry DVO RAS, Russia, Vladivostok
e-mail: popovam@piboc.dvo.ru

Natural phlavone luteolin has a wide circulation in various higher plants and possesses various biomedical activities. Our researches on experimental model of alloxan diabetes and recent researches of foreign authors have shown that at application luteolin the expressed treatment-and-prophylactic effect concerning the pathological disturbances caused by development of a metabolic syndrome is observed. On the basis of the received results and the analysis of the literary data prospective mechanisms of action luteolin are presented. On the basis of this substance creation new biologically active additives and drugs is supposed

ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ЛЮТЕОЛИНА ПРИ НАРУШЕНИЯХ УГЛЕВОДНОГО И ЛИПИДНОГО ОБМЕНА

Кривошапко О.Н., Попов А. М.

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток, Россия
e-mail: popovam@piboc.dvo.ru

В последние годы все большее количество исследователей уделяют пристальное внимание изучению нарушений углеводного и липидного обмена как этиологических факторов развития метаболического синдрома [1, 2]. При этом метаболический синдром чаще всего рассматривается как болезнь воспаления. Природные антиоксиданты, благодаря их участию в сигнальных окислительно-восстановительных путях в клетках, связанных с углеводным и липидным обменом, а также ингибированию перекисного окисления липидов и стабилизации клеточных мембран, создают оптимальные условия для поддержания гомеостаза организма при воздействии патогенных факторов разной этиологии. В связи с этим они находят все более широкое применение при заболеваниях, связанных с нарушением углеводного и липидного обмена. Учитывая этот факт, целью настоящей работы явилось изучение корригирующих свойств лютеолина (ЛТ), обладающего выраженной противовоспалительной и антиоксидантной активностью, при экспериментальных нарушениях углеводного обмена.

Эксперимент проводили на мышах линии СВА весом 18-20 г. Моделирование диабета и методики определения, указанных в таблице 1 биохимических показателей, проводили согласно [1]. ЛТ вводили перорально в дозе 5 мг/кг.

Экспериментальные исследования показали, что ЛТ обладает выраженным коррегирующим действием, способствуя существенной нормализации клинических показателей, которые отражают нарушения как углеводного, так и липидного обмена при аллоксановом диабете (см. табл. 1).

Таблица 1. Коррегирующее действие ЛТ на биохимические параметры крови при аллоксановом диабете

Группы	ГТТ	ТГ	Бил	АСТ	АЛТ	МДА
интактные	11,83±2,41	0,7±0,35	12,42±6,95	2±0,26	1,41±0,37	0,27±0
(-) контроль	24,61±8,73	0,82±0,46	30,07±8,75	2,6±0,38	1,64±0,07	0,41±0,14
Лютеолин	12,3±4,21	0,6±0,43	15,65±2,46	3,39±0,93	3,41±2,38	0,27±0,08
Глибенкламид	17,26±5,25	1,06±0,74	20,38±12,65	2,93±1,29	3,26±2,16	0,26±0,12

Сокращения: ГТТ – глюкозо-толерантный тест, ТГ – триглицериды, Бил – билирубин, АСТ – аспартатаминотрансфераза, АЛТ – алонинаминотрансфераза, МДА – малоновый диальдегид.

Из данных табл. 1 видно, что ЛТ по своим лечебным свойствам не уступает, а в некоторых случаях даже превосходит действие препарата «Глибенкламид», который применяется в случае невозможности достижения компенсации углеводного и липидного обмена на фоне диетотерапии. Возникает вопрос – чем обусловлена столь высокая эффективность протективного и коррегирующего действия ЛТ?

Флавон ЛТ в настоящее время рассматривается как важный элемент функционального питания современного человека. В серии недавних изящных экспериментов [2], в которых одновременно культивировали адипоциты и макрофаги, было показано, что ЛТ может подавлять продукцию воспалительных медиаторов, осуществляющих взаимодействие между ними. ЛТ супрессирует продукцию таких провоспалительных медиаторов, как TNF-α, MCP-1, NO макрофагами, при совместном культивировании с адипоцитами. При этом ЛТ также ингибирует фосфорилирование сигнального метаболического пути JNK и подавляет продукцию провоспалительных медиаторов макрофагами. ЛТ уменьшает инсулиновую резистентность в жировых тканях при ожирении. Другими словами, ЛТ выступает как важный коррегирующий агент при нарушениях, связанных с метаболическим синдромом [2].

В заключение следует сказать, что применение ЛТ приводит к системному улучшению при патологиях, связанных с развитием метаболического синдрома. Поэтому в дальнейшем ЛТ можно использовать в качестве средства профилактики нарушений липидного и углеводного обмена в организме человека.

Литература:

1. *Кривошапко О.Н., Попов А.М., Артюков А.А.* // Применение биоантиоксидантов при нарушениях липидного и углеводного обмена – Здоровье. Мед. экология. Наука. 2009, Т 39-40, № 4-5. с. 86-89.
2. *Ando C, Takahashi N, Hirai S, Nishimura K, Lin S, Uemura T, Goto T, Yu R, Nakagami J, Murakami S, Kawada T.* // Luteolin, a food-derived flavonoid, suppresses adipocyte-dependent activation of macrophages by inhibiting JNK activation. – FEBS Lett. 2009, V. 583, № 22, p. 3649-3654.

PROTECTIVE PROPERTIES OF LUTEOLIN AT DISTURBANCES OF THE CARBOHYDRATE AND LIPID EXCHANGES

Krivoshapko O. N, Popov A.M.

Pacific institute of bioorganic chemistry DVO RAS, Vladivostok, Russia
e-mail: popovam@piboc.dvo.ru

The last years the increasing quantities of researchers pay steadfast attention to studying of disturbances of a carbohydrate and lipid exchange as etiological factors of development of metabolic syndrome [1, 2]. Thus the metabolic syndrome is surveyed as illness of an inflammation. Natural antioxidants, thanking their participation in signal redox ways in the cells connected with carbohydrate and lipid exchanges, and also inhibit lipid peroxidation and stabilized of cellular membranes, created of optimum conditions for maintenance of homeostasis of an organism at influence of pathogenic factors of a different etiology. In this connection they find more and wider application at the diseases connected with disturbance of carbohydrate and lipid exchanges. Considering this fact, the purpose of the present work was studying of corrective properties of luteolin (LT), possessing expressed antiinflammatory and antioxidant activity, at experimental disturbances of carbohydrate and lipid metabolisms.

The experimental carrying out spent on mice of line CBA, weight 18-20 g. The modeling of diabetes and methods of definition of biochemical dates, showed in the table, carrying out according to [1]. LT administrated per os in a dose of 5 mg/kg.

Experimental researches have shown that LT possesses expressed corrective action, promoting essential normalization of clinical indicators which reflect disturbances both carbohydrate, and a lipid exchange at alloxan diabetes (tab. 1 see).

Table 1. Protective action LT on biochemical parameters of plasma at alloxan diabetes

Groups	GTT	TG	Bil	AST	ALT	MDA
intakt	11,83±2,41	0,7±0,35	12,42±6,95	2±0,26	1,41±0,37	0,27±0
(-) control	24,61±8,73	0,82±0,46	30,07±8,75	2,6±0,38	1,64±0,07	0,41±0,14
Luteolin	12,3±4,21	0,6±0,43	15,65±2,46	3,39±0,93	3,41±2,38	0,27±0,08
Glibenclamide	17,26±5,25	1,06±0,74	20,38±12,65	2,93±1,29	3,26±2,16	0,26±0,12

Reductions: GTT – the glucose-tolerant test, TG – triglycerides, Bil – bilirubin, AST – aspartate aminotransferase, ALT – alanine aminotransferase, MDA – malonic dialdehyde.

From data tab. 1 it is visible that LT on the medical properties doesn't concede, but in certain cases even surpasses action of a preparation "Glibenclamide" which is applied in case of impossibility of achievement of indemnification of a carbohydrate and lipid exchanges against background dietotherapy. There is a question – than so high efficiency protective and correction actions LT is caused?

The flavone LT is surveyed as an important element of a functional food of the modern person. In a series of the recent fine experiments using coincubation systems of adipocyte and macrophage, it has been shown that LT can suppress production of the inflammatory mediators which are carrying out interaction between adipocytes and macrophages. LT suppressed production of proinflammatory mediators, such as TNF - α, MCP-1, NO by macrophages in coincubation systems. Thus LT also inhibits phospholiration of signal metabolic way JNK and inhibits production of proinflammatory mediators by macrophages and reduces insulin resistance in adipose tissues at adiposity. In other words, LT acts as important agent for correction at the disturbances connected with metabolic syndrome [2].

In summary it is necessary to tell that application LT leads to system improvement at the pathologies connected with development of metabolic syndrome. Therefore further LT it is possible to use as an agent of preventive maintenance of disturbances lipid and carbohydrate metabolism in a human body.

References:

1. *Krivoshapko O.N., Popov A.M., Artyukov A.A.* // The applications of bioantioxidants at lipids and carbohydrate metabolic imbalances – Healthy. Med. ecology. Nauka. 2009. V 39-40, № 4-5. P. 86-89.
2. *Ando C, Takahashi N, Hirai S, Nishimura K, Lin S, Uemura T, Goto T, Yu R, Nakagami J, Murakami S, Kawada T.* // Luteolin, a food-derived flavonoid, suppresses adipocyte-dependent activation of macrophages by inhibiting JNK activation. – FEBS Lett. 2009, V. 583, № 22, p. 3649-3654

ДЕЙСТВИЕ ЦИТОСТАТИКА ПРОИЗВОДНОГО ДИГИДРОПИРРОЛА НА СЛИЗИСТУЮ ОБОЛОЧКУ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА В СОСТОЯНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Кузнецова Г.Н., Островская Г.В., Рыбальченко В.К., Воловенко Ю.Н., Воловненко Т.А.

Киевский национальный университет им.Тараса Шевченко, Киев, Украина
e-mail: gala_kuznetsova@rambler.ru

В настоящее время проблема поиска эффективных малотолоксичных противоопухолевых препаратов стоит особенно остро. Не менее актуальны вопросы злокачественной трансформации клеток, особенно ранних ее этапов, для наиболее успешной терапии [1]. Известным является нарушение окислительно-восстановительного статуса у малигнизированных клеток, так же как и повышение риска злокачественной трансформации ткани в состоянии хронического окислительного стресса [2,3]. Поэтому представляется интересным исследование влияния потенциальных противоопухолевых препаратов на интенсивно пролиферирующие ткани в состоянии окислительного стресса.

Нами изучено действие производного дигидропиррола (1,4-замещенного 5-амино-1,2-дигидропиррол-3-она, далее Д1, показавшего цитостатическое действие на опухолевые клетки in vitro [4]), на слизистую оболочку толстого кишечника здоровых крыс на фоне Со-индуцированного окислительного стресса [5] на протяжении 10 дней. Для гистологического анализа использовались постоянные препараты ободочной и прямой кишки, окрашенные гематоксилин-эозин-оранжем [6], полученные морфометрические данные были статистически обработаны.

Обнаружено, что Д1 (в дозе 2,3 мг/кг) вызывает незначительные нарушения в сосудистом русле слизистой оболочки (лимфоинфильтрацию в ободочной кишке, лимфостазы в прямой кишке), а также угнетение ее функциональной активности в обоих отделах толстого кишечника, о чем свидетельствуют уменьшение ее толщины, глубины и ширины крипт, а также уменьшение высоты эпителиоцитов и площади сечения их ядер, также уменьшение площади сечения и относительного количества бокаловидных клеток (изменения приведенных параметров в пределах 5-20%). Влияния Д1 на митотический индекс не наблюдается.

$CoCl_2$-индуцированный (доза 13 мг/кг) окислительный стресс проявляется воспалением слизистой оболочки (лимфоинфильтрация и отек, увеличение лимфоузлов) обоих отделов, а также нарушениями в сосудистом русле (кровостазы) прямой кишки. Наблюдаемые изменения морфометрических параметров слизистой обоих отделов (уменьшение ширины крипт, высоты эпителиоцитов, площади сечения их ядер, относительного количества бокаловидных клеток на 5-40%), а также снижение митотического индекса (на 26%) в ободочной кишке могут свидетельствовать [7] об угнетении пролиферативной активности и созревания и, как следствие, угнетении функциональной активности клеток.

Было показано, что Д1 на фоне действия окислительного стресса уменьшает воспалительные явления в слизистой оболочке обоих отделов, а также в некоторой степени нивелирует его последствия для абсорбционных эпителиоцитов в ободочной кишке (отмечается лишь уменьшение их высоты на 4,2%). Изменения остальных морфометрических параметров слизистой оболочки исследуемых отделов толстого кишечника подобны таковым при действии только окислительного стресса.

Итак, Д1 вызывает некоторое угнетение функциональной активности слизистой оболочки толстого кишечника, но не влияет на ее митотическую активность. При действии на фоне окислительного стресса Д1 уменьшает его последствия, в частности признаки воспаления, но практически не влияет на вызванные нарушения пролиферации и созревания клеток. Кроме того, слизистая оболочка ободочной кишки более реактогенна по отношению к влиянию Д1 как отдельно, так и на фоне окислительного стресса, что следует учитывать в дальнейших исследованиях.

Таким образом, исследование Д1 в качестве потенциального противоопухолевого препарата является перспективным. В дальнейшем планируется изучение влияния данного соединения на слизистую оболочку кишечника крыс на фоне хемо-индуцированного канцерогенеза толстой кишки.

Литература:

1. *Букин Ю.В., Драудин-Крыленко В.А.* Молекулярно–биологические механизмы гастроканцерогенеза и подходы к профилактике рака желудка // Успехи биол.химии. – 2000. – Т.40. – С.329-356.
2. *Кондакова И.В., Какурина Г.В., Смирнова Л.П., Борунов Е.В.* Регуляция пролиферации и апоптоза опухолевых клеток свободными радикалами // Сибирский онкологический журнал. - 2005. – Т.13, №1. – С.58-61.
3. *Никитина Н.В., Белоусова Е.А.* Химиопрофилактика колоректального рака: молекулярные механизмы антиканцерогенного действия аминосалицилатов и нестероидных противовоспалительных препаратов // Гастроэнтерология. – 2005. – Т.14, № 109.
4. *Дубініна Г.Г., Воловенко Ю.М.* Сполука 1,4-заміщених 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-онів, що має протиракову активність // Патент № 22204 UA від 25.04.2007.
5. *Калиман П.А., Охрименко С.М.* Цикл глюкоза-жирные кислоты при оксидативном стрессе у крыс, вызваном хлоридом кобальта // Укр.біохім.журн. – 2005. – Т.77, №2. – С.154-158.
6. *Лилли Р.* Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – М.: Мир, 1969. – 648 с.
7. Парфенов А.И. Энтерология. – М.: Триада-Х, 2002. – 744 с.

THE ACTION OF CYTOSTATIC COMPOUND DIHYDROPYRROL DERIVATIVE ON LARGE INTESTINE TUNICA MUCOSA UNDER OXIDATIVE STRESS CONDITION

Kuznetsova G.M., Ostrovska G.V., Rybalchenko V.K., Volovenko Yu.M., Volovnenko T.A.

Kyiv National Taras Shevchenko University, Kyiv, Ukraine
e - mail: gala kuznetsova@rambler.ru

Today the problem of effective low-toxic anticancer drugs design is especially important. The questions of cell malignant transformation, especially its early stages, are actual for the most successful therapy [1]. Malignant cells redox status disturbance, as well as malignant transformation risk increase in tissue under chronic oxidative stress condition, are well known [2,3]. Therefore the investigation of influence of potential anticancer agents on intensively proliferated tissues under oxidative stress condition appears to be interesting.

The action of dihydropyrrol derivative (1,4-substituted 5-amino-1,2-dihydropyrrol-3-one, called D1, showing the cytostatic activity on the tumour cells in vitro [4]) on healthy rats large intestine tunica mucosa (TM) under $CoCl_2$-induced oxidative stress condition [5] during 10 days were investigated. Histologic specimens of colon and rectum tunica mucosa stained with hematoxylin-eosin-orange were analyzed, the obtained morphometric data were statistically examined.

It was discovered that D1 (dose of 2,3 mg/kg bw) caused insignificant vascular disturbances indicated by colon TM lymph infiltration, rectum TM lymphostasises. TM functional activity suppression by D1 in both departments of large intestine, indicated by TM thickness, krypt depths and widths diminution, absorptive epithelial cells height and their nuclei areas, goblet cells areas and their relative amount decrease, were observed. The measured parameters changes oscillated from 5 till 20%. The influence of D1 on mitotical index was not detected.

TM inflammation, indicated by lymph infiltration, edema and lymphonoduses increase in both large intestine departments and vascular thrombosis in rectum, caused by $CoCl_2$-induced (dose of 13 mg/kg bw) oxidative stress, was shown. The observed changes of measured TM parameters in both large intestine departments such as krypt widths diminution, absorptive epithelial cells height and their nuclei areas and goblet cells relative amount decrease (from 5 till 40%), and colon TM mitotical index decrease (on 26%) could testify [7] about proliferative activity and cell maturation inhibition and, as a result, cells functional activity suppression.

Decrease of TM inflammatory phenomena in both large intestine departments under oxidative stress condition, and also its consequences reduce for colon TM absorptive epithelial cells (only absorptive epithelial cells height decrease on 4,2% was marked) caused by D1 application was noticed. The changes of other measured TM parameters in both large intestine departments were similar to such ones under oxidative stress condition without D1 application.

So some suppression of large intestine TM functional activity without inhibition of its mitotical activity, caused by D1, was concluded. Reduce of oxidative stress consequences, such us inflammatory phenomena, without significant effect on cells proliferation and maturation disorders by D1 application were revealed. In addition, more colon TM reactogenicity in respect of D1 effects both separately and under oxidative stress condition were noticed, that is necessary to take into account in further researches.

Thus the investigation of D1 as potential anticancer agent appears to be perspective. The research of D1 effects on rat bowel tunica mucosa under chemo-induced colon cancer condition will be conducted.

References:

1. *Букин Ю.В., Драудин-Крыленко В.А.* Молекулярно–биологические механизмы гастроканцерогенеза и подходы к профилактике рака желудка // Успехи биол.химии. – 2000. – Т.40. – С.329-356.
2. *Кондакова И.В., Какурина Г.В., Смирнова Л.П., Борунов Е.В.* Регуляция пролиферации и апоптоза опухолевых клеток свободными радикалами // Сибирский онкологический журнал. - 2005. – Т.13, №1. – С.58-61.
3. *Никитина Н.В., Белоусова Е.А.* Химиопрофилактика колоректального рака: молекулярные механизмы антиканцерогенного действия аминосалицилатов и нестероидных противовоспалительных препаратов // Гастроэнтерология. – 2005. – Т.14, № 109.
4. *Дубініна Г.Г., Воловенко Ю.М.* Сполука 1,4-заміщених 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-онів, що має протиракову активність // Патент № 22204 UA від 25.04.2007.
5. *Калиман П.А., Охрименко С.М.* Цикл глюкоза-жирные кислоты при оксидативном стрессе у крыс, вызваном хлоридом кобальта // Укр.біохім.журн. – 2005. – Т.77, №2. – С.154-158.
6. *Лилли Р.* Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – М.: Мир, 1969. – 648 с.
7. Парфенов А.И. Энтерология. – М.: Триада-Х, 2002. – 744 с.

ВПЛИВ ЕМБРІОНАЛЬНИХ КУРЯЧИХ АНТИГЕНІВ ТА ФУЛЕРЕНУ C_{60} НА ПРОТИПУХЛИННУ ЕФЕКТИВНІСТЬ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

[1]Кузьменко О.П., [1]Діденко Г.В., [1]Шпак Е.Г., [1]Потебня Г.П., [2]Радченко Є.О., [2]Голуб О.А.

[1]Інститут експериментальної патології,онкології,радіобіології ім.Р.Є.Кавецького НАН України, Київ, Україна
[2]Київський національний університет імені Тараса Шевченка
e-mail: agolub@univ.kiev.ua

Мета. дослідити протипухлинну ефективність ембріональних антигенів курки при комплексному застосуванні з нанокомпозитом фулерен C_{60}–пірогенна силіка (C_{60}-SiO_2) на тваринах з модельною пухлиною карциноми легені Л'юїс (3LL).

Матеріали і методи. Досліди проводили на мишах-самцях лінії C57Bl, масою 18-20 г. Тваринам підшкірно перещеплювали клітини 3LL в дозі 10^6 кл/тварину. На 29 добу після перещеплення частині тварин проводили хірургічне видалення первинної пухлини під єтамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг). На 1-у, 3-ю та 7 добу після видалення пухлини тваринам підшкірно вводили курячі ембріональні білки (КЕБ) раннього періоду гестації (7 доба ембріонального розвитку) самостійно, або в комбінації з нанокомпозитом C_{60}-SiO_2. КЕБ вводили із розрахунку 0,3 мг по білку, а C_{60} - в концентрації 0,2 мг/курс на одну тварину.Було сформовано наступні групи: 1 гр. – контроль пухлинного росту (КПР); 2 гр. склали тварини, яким видалено пухлину хірургічним шляхом (Х); 3 гр. – тварини з хірургічно видаленою пухлиною, яких імунізували КЕБ (Х+КЕБ); 4 гр.- мишам після хірургічного видалення пухлини вводили КЕБ та нанокомпозит C_{60}-SiO_2 (Х+КЕБ+C_{60}); 5 групу склали тварини без операції, яких імунізували КЕБ в комбінації з C_{60}-SiO_2 (КЕБ+C_{60})); 6 гр. – тварини, які отримували C_{60}-SiO_2; 7 гр. – миші, які отримували тільки КЕБ. При комплексному введенні попередньо проводили сорбцію КЕБ на нанокомпозиті C_{60}-SiO_2 протягом 60 хв. при активному перемішуванні. Співвідношення КЕБ/C_{60} становили 0,3 мг білку/0,2 мг комплексу. Імунологічні дослідження проводили на 38 добу після перещеплення 3LL. Цитотоксичну активність клітин-ефекторів визначали по відношенню до пухлинних клітин, виділених з первинного пухлинного вузла та/або з метастазу в легені в МТТ-тесті.

Результати. На 38 добу після перещеплення процент гальмування росту 3LL в гр.6 та 7 був найбільшим і склав 27,3 % ($0,1<P>0,05$), але комплексне застосування КЕБ в комбінації з C_{60}-SiO_2 стимулював ріст пухлини на 3,6% ($P>0,05$).Кількість метастазів у тварин 6 та 7 гр. було найменшим (індекс гальмування складав 37-39%), в той час, як при комплексному застосуванні (гр. 4 та 5) спостерігалась стимуляція метастазування на 14% ($0,1<P>0,05$). Об'єм метастатичного ураження легень при самостійному застосуванні (гр.6 та 7) був найменшим (індекс гальмування складав 89-76%, $P<0,05$). Комбіноване застосування КЕБ з C_{60}-SiO_2 (гр.4) призводило до стимуляції росту метастазів на 26,1%. Індекс гальмування метастазування по кількості та об'єму після радикального оперативного видалення пухлини складав 21,3 та 52,2% відповідно (гр.2). В реакціях цитотоксичної та антитілозалежної активності лімфоцитів, кооперативного лізису і кооперативного лізису з додаванням аутологічної сироватки доведено, що у мишей дослідних груп 6 та 7 цитотоксичний індекс був вірогідно вищий за такий у контролі.

Висновки. Самостійне застосування КЕБ та нанокомплексу C_{60}-SiO_2 в терапії мишей із 3LL супроводжувалось не стільки гальмуванням росту первинної пухлини, скільки гальмувало гематогенне метастазуваня, яке і обумовлює високі показники смертності онкологічних хворих. Одним із можливих механізмів протиметастатичного ефекту, що спостерігався може виступати стимуляція імунної відповіді на введення КЕБ або нанокомпозиту C_{60}-SiO_2. При комплексному застосуванні оперативного лікування, КЕБ та нанокомпозиту C_{60}-SiO_2 спостерігалась стимуляція пухлинного процесу, можливо за рахунок перенавантаження імунної системи антигенами КЕБ та нанокомпозитами в умовах операційного стресу.

Літеретура:

1. *O.Dvorshchenko,G.Didenko,N.Pavluchenko, O. Kuzmenko, O. Golub, E. Radchenko, G. Potebnya.* Modulation of antitumor activity of autovaccine prepared at the exogenous glycoproteids of B. subtilis by nanocomposites of aerosil // Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodovska. 2008. - Vol.21, N 2.- P.321-324.
2. *Didenko G.V., Golub O.A., Kuz'menko O.P., Pavlyuchenko N.V., Radchenko E.O., Potebnya G.P.* THE APPLICATION OF FULLERENE C_{60} FOR MODIFICATION OF ANTI-CANCER VACCINE BASED ON METABOLISM PRODUCTS OF Bacillus subtilis-7025.//J.Cancer Therapy.- 2011.-V.2, N1.

THE INFLUENCE OF CHICKEN EMBRYO ANTIGENS AND FULLERENE C60 ON ANTITUMOR EFFICIENCY

[1]Kuzmenko O.P., [1]Didenko G.V., [1]Shpak E.G., [1]Potebnia G.P., [2]Radchenko E.O., [2]Golub O.A.

[1]R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine
[2]Kyiv National Taras Shevchenko University, Kiev, Ukraine
e-mail: agolub@univ.kiev.ua

Introduction. Antitumor efficiency of chicken embryo antigens and silica-fullerene composite (C_{60}–SiO_2) [1,2] complex application on animals with model Lewis lung carcinoma tumor(3LL) was investigated.

Experimental section. Mail mice of C57BI line with weight of 18-20 g were taken. The cells 3LL in amount of 10^6 cells per animal were injected under the skin. The surgical removal of primary tumor under etaminla-sodium anesthesia (40mg/kg) was made for some animals by the 29-th day after inoculation. The chicken embryo proteins (CEP) of early period of gestation (7 day of embryonic development) were injected under the skin on the first, second and seventh days after surgery. The proteins (CEP) were injected individually and in complex application with fullerene composite (C_{60} SiO_2). CEP was injected in a rate of 0.3 mg of protein and C_{60}–SiO_2 in a rate of 0.2 mg of composite per treatment per one animal. The seven group of animals were formed: 1- control of tumor growth; 2- animals with surgically removed tumor; 3- animals with surgically removed tumor which were immunized by CEP (S+CEP); 4- animals with surgically removed tumor which were immunized by complex application CEP and C_{60} SiO_2 (S+CEP+C_{60}); 5 – animals without surgery which were immunized by complex application CEP and C60 SiO2 (CEP+C_{60}); 6- animals which were treated by standalone C_{60}–SiO_2; 7 - animals which were treated by standalone CEP. For complex application of CEP and C_{60}–$SiO_2$the presorption of CEP on the C_{60}–SiO_2surface was made within the hour under active mixing. The concentration of CEP/C_{60} was 0.3/0.2 mg. Immunological investigation was performed on 38-th day after grafting of the 3LL tumor. Cytotoxic activity of effectors cells against tumor cells which where taken from primary tumor site or/and from lung metastases was investigated in MTT – test.

Results and Discussion. On 38-th day after grafting of the 3LL tumor the biggest inhibition percentage of tumor growth was in 6 and 7 groups – 27.3 % ($0.1<P>0.05$). But complex application CEP and C_{60}–SiO_2 stimulated the tumor growth by 3,6% ($P>0,05$). The 6 and 7 groups of animals had lowest number of metastases. The inhibition index was 37-39%. While as in the groups 4 and 5 which were treated by complex application of CEP and C_{60}-SiO_2 the metastases growth was stimulated by 14% ($0.1<P>0.05$). The groups 6 and 7 which where treaded by standalone CEP or C_{60}–SiO_2had the lowest volume of metastasis lesions. The inhibition index was 89-76% ($P<0.05$). On the other hand the metastases growth was stimulated on 26.1% by complex application of S+CEP+C_{60} (group 4). The amount and volume indexes of inhibition of metastasis in group 2 were 21.3 and 52.2%.

In the group 6 and 7 the cytotoxic index was significantly higher. It was shown in the reactions of cytotoxic lymphocytes and antibody activity of cooperative lysis and cooperative lysis with addition of autologous serum.

Conclusions. The standalone application of CEP or C_{60}–SiO_2in 3LL tumor treatment in mice does not inhibit primary tumor growth but mainly inhibit hematohen metastasis which is responsible for high mortality rates of breast cancer patients. It is possible that standalone CEP or C_{60}–SiO_2treatment can stimulat the immune response that leads to antimetastatic effect. While as the immune system which is under operational stress may be overload by CEP antigens by complex application of CEP and C_{60}–SiO_2.

References:

1. *O.Dvorshchenko,G.Didenko,N.Pavluchenko, O. Kuzmenko, O. Golub, E. Radchenko, G. Potebnya.* Modulation of antitumor activity of autovaccine prepared at the exogenous glycoproteids of B. subtilis by nanocomposites of aerosil // Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodovska. 2008. - Vol.21, N 2.- P.321-324.
2. *Didenko G.V., Golub O.A., Kuz'menko O.P., Pavlyuchenko N.V., Radchenko E.O., Potebnya G.P.* THE APPLICATION OF FULLERENE C60 FOR MODIFICATION OF ANTI-CANCER VACCINE BASED ON METABOLISM PRODUCTS OF Bacillus subtilis-7025.//J.Cancer Therapy.- 2011.-V.2, N1.

НАНОТЕХНОЛОГИИ, КОНФОРМАЦИОННЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ И ФАРМАКОЛОГИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Леонидов Н.Б., Яковлев Р.Ю.

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Рязань, Россия.
e-mail: n.leonidov@rambler.ru

Возможность повышения биологической активности биологически активных веществ (БАВ) является одной из основных проблем их химии и технологии. В настоящее время основными путями достижения этой цели являются синтез, в том числе стереоспецифический, извлечение или скрининг. Нами разработаны нанотехнологии, приводящие к конформационному полиморфизму образующихся наночастиц БАВ, который может направленно изменять как фармакокинетику, так и фармакодинамику БАВ, что обеспечивает синергетическое повышение терапевтического эффекта вещества [1].

Полученная по такой технологии (LEUS-технология) новая метастабильная β-форма тетракаина гидрохлорида (Леокаин®) конформационно отличается от промышленного препарата (α-формы) [2]. Специфическая местноанестезирующая активность леокаина оказалась в 3,3 раза выше, липофильность – в 4 раза выше, а аллергенность снижена в 4 раза по сравнению с промышленным препаратом [3]. При этом стабильность водных растворов леокаина без стабилизаторов и консервантов превышает 3 года, в то время как растворы тетракаина гидрохлорида теряют свою активность уже в течение месяца. Работа по созданию и внедрению в медицинскую практику леокаина отмечена премией Правительства РФ.

Также получены и внедрены в медицинскую практику новая полиморфная форма метилурацила (Бетамецил®) и мазь бетамецила 2% глазная. Бетамецил показал увеличение регенераторной активности по сравнению с метилурацилом более чем в 5 раз при раннем начале эпителизации роговицы и быстром восстановлении всего эпителиального пласта по сравнению с мазью метилурацила 10%. Полученный нами препарат в клинической практике показал ускорение рассасывания транссудата и инфильтрации, ранее отторжение некротических участков, быстрое восстановление жизнедеятельности тканей и предотвращение возможного развития вторичной инфекции. Показано, что различия биологической активности бетамецила проявляются, в частности, в изменении активности ферментов нуклеиновых кислот, окислительного фосфолирирования митохондрий, антиоксидантной активности и составе липидов, торможении свободной активности лизосомальных гидролаз и, наконец, таких интегральных показателей, как скорость развития и продолжительность жизни биообъектов [4].

Все эти лекарственные субстанции и их лекарственные формы являются высокоэффективными оригинальными патентнозащищенными лекарственными средствами, обладающие как импортозамещающим, так и экспортным потенциалом.

Возможность проявления подобного эффекта нами показана и в случае создания нового поколения систем доставки БАВ с использованием в качестве наноносителя детонационных наноалмазов [5]. Перспективность таких систем доставки БАВ основана на разработанной нами нанотехнологии, позволяющей снизить токсичность вещества, улучшить трансмембранную активность, в том числе через гематоэнцефалический барьер, а также изменять конформацию иммобилизованных молекул БАВ [6]. Это позволяет рассматривать конформационную подвижность ковалентно связанных молекул с поверхностью наноалмаза частным случаем конформационного полиморфизма как в двух – так и трехмерном пространствах. Подобный эффект определяется химической природой БАВ, составом и количеством поверхностных функциональных групп наноносителя. Наноразмерность полученных систем доставки и широта комплементарной подстройки иммобилизованных молекул к структуре рецептора приводит к возможности также изменения их фармакокинетики и фармакодинамики, что, в целом, способно обеспечить направленный синергетический эффект усиления фармакологического действия БАВ.

К настоящему времени на основе детонационных наноалмазов нами созданы системы доставки ряда социально значимых лекарственных веществ и проводится их доклиническое исследование.

Работа выполнена при финансовой поддержке Миннауки России и гранта РФФИ (проект №11-03-00543).

Литература:

1. *N.B. Leonidov* // Polymorphism and Specific Character of Drugs Biological Activity − Pharm. Res., 1996, v. 13, N9, p. 343.
2. *R.J. Papoular, B.H. Toby, J. Doebbler, N.B. Leonidov, M.-N. Petit, A.V. Dzyabchenko, J.-M. Cense, H. Allouchi, V. Agafonov* // *Ab initio* crystal structure determination of two polymorphic modifications of an anesthetic agent, Tetracaine hydrochloride, using a combination of molecular modeling and synchrotron X-ray powder diffraction techniques – Pharm. Powder X-ray Diffr. Symp. 9th, Hilton Head Island, S.C., USA, 2010, p. 22.
3. *Н.Б. Леонидов, С.И. Успенская, В.В. Гацура* // Физико-химические свойства леокаина и особенности его биологической активности в сравнительном аспекте с дикаином – Рос. хим. журн., 1997, т. 41, N5, с. 53-60.
4. *N.B. Leonidov* // Molecular mechanism of the woundhealing action of Betamechil – J. Pharm. Pharmacol, 1998, v. 50, Suppl., p. 248.
5. *И.И. Кулакова, В.В. Корольков, Р.Ю. Яковлев, Г.В. Лисичкин* // Строение частиц химически модифицированного наноалмаза детонационного синтеза – Рос. нанотех., 2010, т. 5, вып. 7-8, с. 66-73.
6. *Н.Б. Леонидов, Н.Г. Селезенев, Р.Ю. Яковлев* // Перспективность применения наноалмазов в качестве носителей для систем доставки лекарственных веществ – Медицина в Кузбассе, 2009, Спецвып. N7, с. 56-57.

NANOTECHOLOGY, CONFORMATIONAL POLYMORPHISM AND PHARMACOLOGY OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Leonidov N.B., Yakovlev R.Ju.

Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia
e-mail: n.leonidov@rambler.ru

The perspective to increase the biological activity of bioactive substances (BAS) comprises one of the main problems of their chemistry and technology. At present the main methods to achieve this goal are synthesis, including stereospecific, extraction and screening. We designed nanotechnology resulting in conformational polymorphism of BAS nanoparticles that might directionally change the BAS pharmacokinetics and pharmacodynamics that asserts the synergetic increase of the substance therapeutic effect [1].

New metastable β-form of Tetracaine Hydrochloride (Leocaine®) obtained according to the above mentioned technology (LEUS-technology) is conformationally different from the industrial preparation (α-form) [2]. The specific local anesthetic Leocaine activity was found to be 3,3 times higher, lipophilicity 4 times higher and allergenicity 4 times lower in comparison with the industrial preparation [3]. At the same time the stability of the Leocaine aqueous solutions without stabilizers and conservants exceed 3 years while the Tetracaine Hydrochloride solutions lose their activity already in a month. The work on creation and introduction into medical practice of Leocaine was awarded by the prize of RF Government.

Also new polymorphic form of Methyluracil (Betamecil®) and eye ointment betamecil 2% were synthesized and introduced into medical practice. Betamecil showed the increased regenerative activity more than 5 times in comparison with Methyluracil at the early stage of cornea epithelialization and fast regeneration of the whole epithelial layer in comparison with methyluracil ointment 10%. The obtained preparation in clinical practice showed the acceleration of transudate and infiltration resolve, early rejection of necrotized area, fast regeneration of tissue vital activity and preclude the possible development of secondary infection. It is shown that the difference in Betamecil biological activity appear in particular in the change of activity of nucleic acid enzymes, oxidative phosphorylation in mitochondria, antioxidative activity and lipid composition, inhibition of free activity of lysosomal hydrolases and finally such integral indexes as the speed of development and longevity of bioobjects [4].

All these pharmaceutical substances and drug formulations constitute highly effective original drug forms protected by patents that have import-substituting an export potential.

The possibility to manifest such effect was shown by us also in case of creation of the new generation of BAS delivery systems using detonation nanodiamonds as nanocarriers [5]. The perspective of such BAS delivery systems was based on nanotechnology developed by us which allowed to decrease the toxicity of the substance, to increase the transmembrane activity including hematoencephalic barrier and also to change the conformation of immobilized BAS molecules [6]. It is possible to consider the conformational mobility of covalently bonded with the nanodiamond surface molecules as a special case of conformational polymorphism (2D and 3D). Such an effect is determined by BAS chemical nature, composition and quantity of surface functional groups on the nanocarrier. Nanodimensionality of delivery systems obtained and the width of complementary adjustment of the immobilized molecules to the receptor structure give us the possibility to change also pharmacokinetics and pharmacodynamics that, as a whole, makes it possible to provide the directional synergetic effect of increasing BAS pharmacological activity.

By present on the basis of detonation nanodiamonds we created the delivery systems of several social important drug substances that are at the stage of preclinical research.

This work was supported financially by Russian Ministry of Science and RFBR grant (project №11-03-00543).

References:

1. *N.B. Leonidov* // Polymorphism and Specific Character of Drugs Biological Activity − Pharm. Res., 1996, v. 13, N9, p. 343.
2. *R.J. Papoular, B.H. Toby, J. Doebbler, N.B. Leonidov, M.-N. Petit, A.V. Dzyabchenko, J.-M. Cense, H. Allouchi, V. Agafonov* // *Ab initio* crystal structure determination of two polymorphic modifications of an anesthetic agent, Tetracaine hydrochloride, using a combination of molecular modeling and synchrotron X-ray powder diffraction techniques – Pharm. Powder X-ray Diffr. Symp. 9th, Hilton Head Island, S.C., USA, 2010, p. 22.
3. *N.B. Leonidov, S.I. Uspenskaya, V.V. Gatsura* // Leocaine physic-chemical properties and peculiarities of its biological activity in comparison with Dicaine. – Rus.. Chem. J., 1997, v. 41, N5, c. 53-60.
4. *N.B. Leonidov* // Molecular mechanism of the woundhealing action of Betamecil – J. Pharm. Pharmacol, 1998, v. 50, Suppl., p. 248.
5. *I.I. Kulakova, V.V. Korolkov, R.Ju. Yakovlev, G.V. Lisichkin* // The structure of chemically modified nanodiamond particles synthesized by detonation – Nanotechnology in Russia, 2010, v. 5, N7-8, p. 66-73.
6. *N.B. Leonidov, N.G. Selezenev, R.Ju. Yakovlev* // The perspective application of nanodiamonds as carriers for the drug delivery systems. – Medicine in Kuzbass, 2009, Spec. Issue N7, p. 56-57.

ВПЛИВ НЕСТЕРОЇДНИХ ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЗАСОБІВ НА АКТИВНІСТЬ АТР-ГІДРОЛАЗНИХ ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ СИСТЕМ І СИСТЕМ ПРОДУКЦІЇ NO У ЛІМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ХВОРИХ НА РЕВМАТИЧНІ ЗАХВОРЮВАННЯ

Личковська Н.Е., Фафула Р.В., Воробець З.Д.

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

На сьогодні ревматичні захворювання (РЗ) – одна з найпоширеніших патологій у світі. РЗ – група мультифакторних хвороб, представлених великою кількістю нозологічних форм, які відрізняються за походженням і об'єднані, переважно за ознакою локалізації основного патологічного процесу у сполучній тканині. Фармакотерапія РЗ – одна з актуальних проблем сучасної медицини і фармації.

Найважливішим напрямком фармакотерапії РЗ є призначення нестероїдних протизапальних препаратів (ПНЗП) – групи лікувальних засобів, які сприяють розвитку повільного терапевтичного ефекту, що настає поступово, пригнічуючи клінічні, біохімічні та імунологічні прояви патологічного процесу. НПЗП – найбільш важлива група препаратів із симптоматичною дією, які використовуються у пацієнтів із РЗ, що зумовлено абсолютно унікальною комбінацією протизапальної, анальгетичної, жарознижувальної та антитромбоцитарної дії, що здійснює вплив на весь спектр основних клінічних симптомів, характерних для РЗ. Незважаючи на багаторічну історію застосування та велику кількість клінічних досліджень все ще залишаються невирішеними ряд питань, щодо обґрунтування оптимальної тактики застосування НПЗП. Тому з'ясування їх впливу на імунну систему є актуальним розділом імунофармакології.

Метою нашого дослідження було вивчення змін активності Na^+, K^+-АТФази та аргінази у лімфоцитах периферичної крові хворих на ревматоїдний артрит (РА). Визначення активності досліджуваних ензимів проводили на момент поступлення хворих на лікування у стаціонарне відділення і після проведення лікування у стаціонарі. В якості НПЗП хворим призначали мелоксикам (4-гідрокси-2-метил-N-(5-метил-1,3-тіазол-2-ил)-2Н-1,2-бензотіазин-3-карбоксамід-1,1-діоксид).

Вплив різних протизапальних засобів на імунну систему потребує спеціального вивчення, так як далеко не всі протизапальні засоби мають бажану імунокорегуючу дію. Відомо, що запальний процес у суглобах обумовлений імунологічними механізмами. Про це свідчить, інфільтрація лімфоцитами і макрофагами, швидкий розвиток фіброзної рубцевої тканини. При тривалому застосуванні НПЗП виявляється вплив на різні ланки імунної системи – певні етапи формування імунної відповіді [1]. Зокрема, вони гальмують міграцію стовбурових клітин, Т- і В- лімфоцитів, перешкоджають передаванню антигенної інформації за рахунок зниження фагоцитарної активності та хемотаксису фагоцитів [2].

Протягом останнього десятиліття у клінічну практику були активно впроваджені група нових НППЗ – високоселективних інгібіторів циклооксигенази -2 (ЦОГ-2), зокрема мелоксикам [3]. Наслідком блокування ЦОГ є зниження утворення простагландину Е2 (ПГЕ2). Відомо, що ПГЕ бере участь у підготовці лімфоцитів до поділу і блокування його синтезу, порушує процес поділу лімфоцитів і їх бласттрансформацію. Таким чином НПЗП мають модулюючий вплив на імунну систему.

Показана динаміка змін ензиматичної активності Na^+, K^+-АТФази та аргінази лімфоцитів периферичної крові хворих на РА після проведеного лікування у стаціонарі мелоксикамом. У хворих на РА Na^+, K^+-АТФазна активність лімфоцитів периферичної крові істотно відрізняється від контрольної групи і становить 6,65±0,44 мкмоль P_i/хв·мг білка, після лікування спостерігається зростання активності ензиму до 8,09±0,45 мкмоль P_i/хв·мг білка. Активність аргінази, яка забезпечує неокисний шлях продукції NO у хворих на РА становить 295±11,66 нмоль сечовини/хв·мг білка і 179±6,12 нмоль сечовини/хв·мг білка на момент поступлення і після проведеного стаціонарного лікування відповідно.

Визначення ензиматичної активності Na^+, K^+-АТФази та аргінази лімфоцитів периферичної крові дає якісну інформаційну оцінку про функціонування імунокомпетентних клітин, а також може мати практичне значення для оцінки фармакотерапії НПЗП.

Література:

1. *О.М. Поета, І.В. Котік, С.М. Коряк.* // Вивчення пливу диклофенаку натрію, мелоксикаму та целекоксибу на гуморальний імунітет. Матеріали науково-практичної конференції «Безпечна фармакотерапія в Україні». – Тернопіль, 2008. – с.62-63.
2. *А.И. Трещинский, Л.В. Усенко, И.А. Зупанец.* // Современные аспекты рационального обезболивания в медицинской практике (практическое руководство). К.: Морион. – 2000. – 63 с.
3. *О.Макаренко, В.Мамчур.* // Інгібітори циклооксигенази – як зробити правильний вибір неопіоїдного анальгетика? // Вісник фармакології та фармації. – 2007. – N8. – с.48-54.

EFFECTS NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG ON THE ACTIVITY OF ATP HYDROLYSIS SYSTEM AND NO PRODUCTION SYSTEMS IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH RHEUMATIC DISEASES

Lychkovska N.E., Fafula R.V., Vorobets Z.D.

Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Nawaday rheumatic diseases (RD) – are the most common pathologies in the world. RD are a group multifactor diseases which include a variety of nosological forms that differ by origin and are associated with the localization of the main pathological process in connective tissue. Pharmacotherapy of RD is one of the urgent problems of modern medicine and pharmacy.

The most important trend in pharmacotherapy of RD is application of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). NSAIDs are a medication group that help the development of a slow therapeutic effect, which occurs gradually, suppressing clinical, biochemical and immunological effects of pathological process. NSAIDs are the most important medication group with a symptomatic effect that is used in treatment of patients with RD because of the absolutely unique combination of anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and antiplatelet actions, which causes influence clinical RD symptoms. Despite the long history of NSAIDs' application in medicine and a large number of clinical studies some questions concerning NSAIDs' tactics still remain. That is why the identification of NSAIDs' impact on the immune system is an important task of immunopharmacology.

The aim of our study was to study the Na^+, K^+-ATPase and arginase activity in peripheral blood lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis (RA). Determination of enzymes activity was carried out twice – at the time patients came to a hospital and after treatment in hospital. The meloxicam (4-hydroxy-2-methyl-N-(5-methyl-1,3-thiazole)-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide-dioxide-1) was prescribed as NSAID.

Influence of various anti-inflammatory drugs on the immune system requires a special study, since not all NSAIDs have the desired immunotherapy effect. It is known that inflammation in the joints caused by immunological mechanisms. The infiltration of lymphocytes and macrophages, the rapid development of fibrous scar tissue demonstate this. During prolonged NSAIDs application the influence on different parts of immune system appears [1]. In particular, NSAIDs impede the migration of stem cells, T- and B- lymphocytes, prevent ransmission of antigenic information by reducing the phagocytic activity and phagocyte chemotaxis [2].

Over the last decade in clinical practice the new group of highly selective inhibitors of cyclooxygenase -2 (COG-2) was introduced. Meloxicam belong to this NSAID group [3]. The result of COG blocking is a decrease prostaglandin E2 production (PGE2). It is known that PGE is involved in the preparation of lymphocytes to the mitosis and causes blocking its synthesis and their blasttransformation. Thus, NSAIDs have a modulation effect on the immune system.

It was shown the dynamics of Na^+, K^+-ATPase and arginase activity in peripheral blood lymphocytes in patients with RA after treatment in hospital by Meloxicam. In patients with RA Na^+, K^+-ATPase activity in peripheral blood lymphocytes significantly different from control group and is 6,65±0,44 micromol P_i/min·mg protein, after treatment there is a increase of enzyme activity to 8,09±0,45 micromol P_i/min·mg protein. Arginase activity in in peripheral blood lymphocytes in RA patients is 295±11,66 nmol urea/min·mg protein and 179±6,12 nmol urea/min·mg protein, respectively.

Determination of enzymatic Na^+, K^+-ATPase and arginase activity in peripheral blood lymphocytes provides high quality information and assessment about the functioning of immunocompetent cells, and may have practical value for estimation of NSAIDs pharmacotherapy.

Reference:

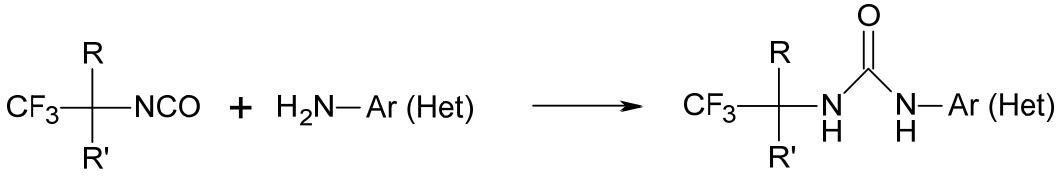
1. *O.M. Poeta, I.V. Kotikov, S.M. Kodak.* // Study of diclofenac sodium, meloxicam and celecoxib influence on the humoral immunity system // Conference "Safe pharmacotherapy in Ukraine". - Ternopil, Ukraine., 2008. – p. 62-63.
2. *A.I. Treschynskyy, L.V. Usenko, I.A. Zupanets.* // Modern aspects of rational anastasia in medical practice (Manual). Kiev, Morion. – 2000. – 63p.
3. *A. Makarenko, V. Mamchur* // Cyclooxygenase inhibitors – how to make the right choice of non-opium analgesic? Journal of Pharmacology and Pharmacy. – 2007. – N8. – p. 48-54.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ *N*-(α-ТРИФТОРМЕТИЛ)АЛКИЛ-*N'*-ЗАМЕЩЕННЫХ МОЧЕВИН

[1]Лузина Е.Л., [2]Попов А.В.

[1]Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Московская область, Россия
e-mail: luzina@ipac.ac.ru
[2]Университет Пенсильвании, Отдел радиологии, Филадельфия, США
e-mail: avpopov@mail.med.upenn.edu

Синтезированы *N*-(α-трифторметил)алкил-*N'*-замещенные мочевины и исследована их противоопухолевая активность *in vitro* на 60 линиях клеток в Национальном Институте Рака (США).



R = H, CH_3, C_2H_5 R' = H, CF_3

Мочевины с заместителями R = Et и R'= CF_3 проявили более высокую противоопухолевую активность по сравнению с другими С-заместителями. Среди арил/гетарил *N'*-заместителей, наибольшую активность проявили 2,5-дихлорфенил мочевины). *N'*-Тиазолил- и *N'*- бензотиазолил замещенные мочевины проявили средний уровень активности. В тоже время, все мочевины были активны в отношении следующих линий опухолевых клеток: PC-3 (рак простаты), SNB-75 (рак ЦНС), UO-31 (рак почек), and SR (лейкемия).

Степень подавления роста клеток оценивалась по параметрам GI_{50} ,TGI и LC_{50}.

Концентрации 50% ингибирования роста раковых клеток (GI_{50}) находятся в интервале $10^{-4} \div 10^{-7}$ M, а концентрации TGI и LC_{50} находятся в интервале $10^{-4} \div 10^{-5}$ M.

Наиболее чувствительные линии опухолевых клеток в отношении протестированных соединений следующие:

PC-3 (рак простаты):
R=Et, R'= CF_3, Het = 2-thiazolyl, *log*GI_{50} = -7.10
R=Et, R'= CF_3, Ar = 2,5-dichlorophenyl, *log*GI_{50} = -5.66
SNB-75 (рак ЦНС):
R=Me, R'= CF_3, Het = 2-benzothiazolyl, *log*GI_{50} = -5.44
R=Et, R'= CF_3, Het = 2-benzothiazolyl, *log*GI_{50} = -5.84
UO-31 (рак почек):
R=Me, R'= CF_3, Ar = 2,5-dichlorophenyl, *log*GI_{50} = -5.62
R=Me, R'= CF_3, Het = 2-thiazolyl, *log*GI_{50} = -5.66
R=H, R'= CF_3, Het = 2-thiazolyl, *log*GI_{50} = -5.49
Рак толстого кишечника:
COLO 205: R=Et, R'= CF_3, Ar = 2,5-dichlorophenyl, *log*GI_{50} = -5.74
HCC-2998: R=Et, R'= CF_3, Ar = 2,5-dichlorophenyl, *log*GI_{50} = -5.94

Мочевины с заместителями R = R' = H в настоящее время исследуются на противоопухолевую активность.

Литература:

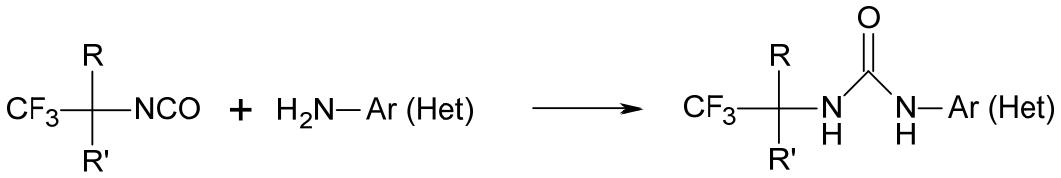
1. *E.L. Luzina, A.V. Popov* // Synthesis and anticancer activity of *N*-bis(trifluoromethyl)alkyl-*N'*-thiazolyl and *N*-bis(trifluoromethyl)alkyl-*N'*-benzothiazolyl ureas - Eur. J. Med. Chem. 2009, vol. 44, N 12, pp. 4944-4953.
2. *E.L. Luzina, A.V. Popov* // Anticancer activity of *N*-bis(trifluoromethyl)alkyl-*N'*-(polychlorophenyl) and *N'*-(1,2,4-triazolyl) ureas – Eur. J. Med. Chem. 2010, vol. 45, N 11, pp. 5507-5512.

ANTICANCER ACTIVITY OF N-(α-TRIFLUOROMETHYL)ALKYL-N'-SUBSTITUTED UREAS

[1]Luzina E.L., [2]Popov A.V.

[1]Institute of Physiologically Active Compounds, Chernogolovka, Moscow region, Russia
e-mail: luzina@ipac.ac.ru
[2]University of Pennsylvania, Department of Radiology, Philadelphia PA, USA
e-mail: avpopov@mail.med.upenn.edu

A number of N-(trifluoromethyl)alkyl-N'-aryl/hetaryl-substituted ureas has been synthesized and evaluated for their *in vitro* antiproliferative activities against 60 human cancer cell lines at the National Cancer Institute (NCI), USA.



R = H, CH_3, C_2H_5 R' = H, CF_3

The ureas with R = Et and R'= CF_3 revealed higher activity in comparison with the other C-substituents. Among the aryl/hetaryl N'-substituents, the most active were polychlorophenyl (especially, 2,5-dichlorophenyl) ones. N'-thiazolyl- and N'-benzothiazolyl ureas demonstrated moderate activity. All these ureas were active against the next cell lines: PC-3 (prostate cancer), SNB-75 (CNS cancer), UO-31 (renal cancer), and SR (leukemia).

Growth inhibitory concentration for cancer cell lines (GI_{50}) were within the range of $10^{-4} \div 10^{-7}$ M, TGI and LC_{50} were within the range of $10^{-4} \div 10^{-5}$ M.

The most sensitive cell lines relative to the tested compounds are:

PC-3 (prostate cancer):
R=Et, R'= CF_3, Het = 2-thiazolyl, *log*GI_{50} = -7.10
R=Et, R'= CF_3, Ar = 2,5-dichlorophenyl, *log*GI_{50} = -5.66
SNB-75 (CNS cancer):
R=Me, R'= CF_3, Het = 2-benzothiazolyl, *log*GI_{50} = -5.44
R=Et, R'= CF_3, Het = 2-benzothiazolyl, *log*GI_{50} = -5.84
UO-31 (renal cancer):
R=Me, R'= CF_3, Ar = 2,5-dichlorophenyl, *log*GI_{50} = -5.62
R=Me, R'= CF_3, Het = 2-thiazolyl, *log*GI_{50} = -5.66
R=H, R'= CF_3, Het = 2-thiazolyl, *log*GI_{50} = -5.49
Colon cancer:
COLO 205: R=Et, R'= CF_3, Ar = 2,5-dichlorophenyl, *log*GI_{50} = -5.74
HCC-2998: R=Et, R'= CF_3, Ar = 2,5-dichlorophenyl, *log*GI_{50} = -5.94

The ureas with R = R' = H are still under evaluation of their anticancer activity.

References:

1. *E.L. Luzina, A.V. Popov* // Synthesis and anticancer activity of *N*-bis(trifluoromethyl)alkyl-*N'*-thiazolyl and *N*-bis(trifluoromethyl)alkyl-*N'*-benzothiazolyl ureas - Eur. J. Med. Chem. 2009, vol. 44, N 12, pp. 4944-4953.
2. *E.L. Luzina, A.V. Popov* // Anticancer activity of *N*-bis(trifluoromethyl)alkyl-*N'*-(polychlorophenyl) and *N'*-(1,2,4-triazolyl) ureas – Eur. J. Med. Chem. 2010, vol. 45, N 11, pp. 5507-5512.

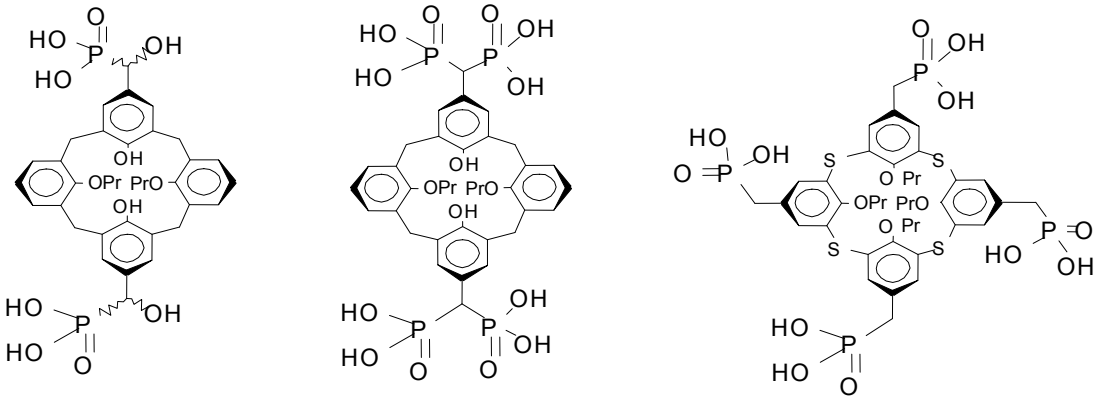
ВИКОРИСТАННЯ КАЛІКСАРЕНІВ В ЯКОСТІ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНИХ СПОЛУК, ЗДАТНИХ МОДУЛЮВАТИ ЧУТЛИВІСТЬ ЗЛОЯКІСНИХ КЛІТИН ДО ПРОТИПУХЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ

[1]Лук'янова Н.Ю., [2]Черенок С.О., [2]Драпайло А. Б., [2]Кальченко В.І., [1]Чехун В.Ф.

[1]Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України, Київ, Україна. e-mail: oncom@onconet.kiev.ua
[2]Інститут органічної хімії НАН України, Київ, Україна

Однією з найбільших перешкод при лікуванні хворих на злоякісні пухлини, в тому числі – на рак молочної залози та рак яєчника, є лікарська резистентність пухлин до цитотоксичної дії протипухлинних препаратів. До складу багатьох схем протипухлинної терапії входять антрацикліни, зокрема – доксорубіцин. Резистентність до доксорубіцину за загальноприйнятою концепцією обумовлена гіперекспресією Р-глікопротеїду (Pgp) з молекулярною масою 170 kDa, який є енергозалежною помпою, що викидає ксенобіотики натурального походження з клітин. Останнім часом в літературі з'явились дані, що свідчать про можливість використання каліксаренів в якості сполук, здатних впливати на активність певних білків, асоційованих з лікарською резистентністю. Ці дані відкривають перспективу вивчення каліксаренів в якості біологічно-активних сполук, здатних модулювати чутливість злоякісних клітин до протипухлинних препаратів.

В системі in vitro на моделі вихідних та резистентних до доксорубіцину клітин раку молочної залози та раку яєчника людини проведено дослідження біологічних властивостей низки каліксаренів. Виявлено незначну цитотоксичну активність (тіа)каліксаренів функціоналізованих фрагментами бісфосфонових, α-гідроксиметилфосфонових та метиленфосфонових кислот (рис. 1 А, Б, В) по відношенню як до вихідних, так і до резистентних клітин раку молочної залози та раку яєчника людини.



А **Б** **В**

Показано, що під впливом каліксаренфосфонових кислот в клітинах досліджуваних ліній, резистентних до доксорубіцину (MCF-7/Dox та A2780/Dox) знижується експресія білку, асоційованого з лікарською резистентністю (Р-глікопротеїну) та антигену проліферуючих клітин (Ki-67). Поряд з цим, встановлено, що каліксаренфосфонові кислоти здатні підвищувати цитотоксичну активність доксорубіцину по відношенню до клітин раку молочної залози людини ліній MCF-7/S, MCF-7/Dox, A2780/S та A2780/Dox на 15, 13, 11 та 9%, віповідно. Отримані дані свідчать про перспективність вивчення біологічної дії каліксаренів, які мають специфічні сайти зв'язування з відповідними антигенами, на моделі експериментальних тварин в системі *in vivo* в якості біологічно-активних сполук, здатних модулювати чутливість злоякісних клітин до протипухлинних препаратів.

Робота підтримана договором №2.2.5.319/2 програми "Новітні медико-біололгічні проблеми та навколишнє середовище людини" 2007-2009рр.

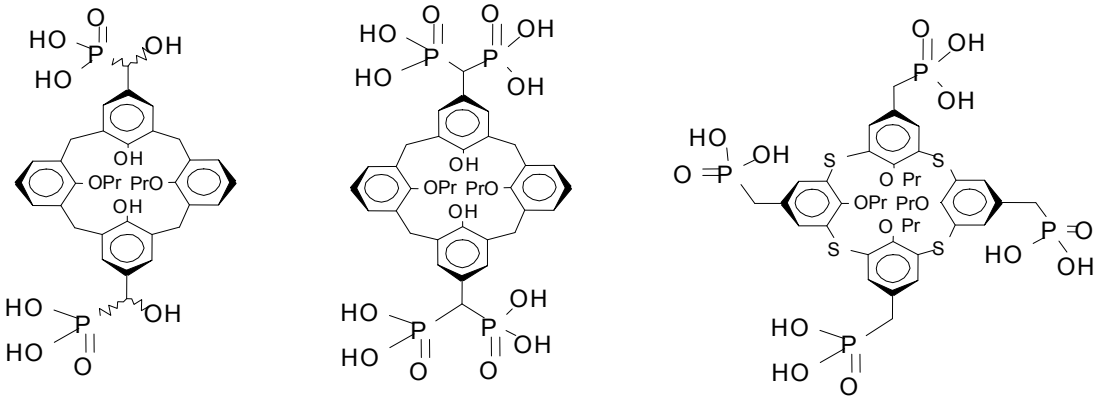
USE OF CALLIXARENES AS BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES, WHICH ARE ABLE TO MODULATE SENSITIVITY OF MALIGNANT CELLS TO ANTITUMOR DRUGS

[1]Lukyanova N.Yu., [2]Cherenok S.O., [2]Drapaylo A.B., [2]Kal'chenko V.I., [1]Chekhun V.F.

[1]R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine. e-mail: oncom@onconet.kiev.ua
[2]Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Tumor resistance to cytotoxic action of antitumor drugs is one of the major problems in treatment of patients with malignant tumors, including breast and ovarian cancers. Many chemotherapeutic schemes include anthracyclines, especially – doxorubicin. It is thought that resistance to doxorubicin is mediated by oerexpression of P-glycoprotein (Pgp) with molecular weight 170 kDa, an energy-dependent pump which discards xenobiotics of natural origin from cells. During last few years some data about possibility of callixarene use as substances which could influence on activity of some proteins, associated with drug resistance appeared in literature. These data open up the perspective of studying callixarenes as biologically active substances, which are able to modulate sensitivity of malignant cells to antitumor drugs.

We performed in vitro test of biological properties of different callixarenes using the models of sensitive and resistant to doxorubicin breast and ovarian cancer cells. We detected low cytotoxic activity of (thia)callixarenes, functionalized by fragments of bisphosphonic, α-hydroxymethylphosphonic and methylenephosphonic acids (Fig. 1 A, B, C) against both sensitive and resistant breast and ovarian cancer cells.



А **Б** **В**

We revealed, that in studied doxorubicin-resistant cell lines (MCF-7/Dox and A2780/Dox) expression of drug resistance associated protein (Pgp) and proliferative cells antigen (Ki-67) were reduced under callixarenephosphonic acids impact. We also showed that callixarenephosphonic acids were able to elevate the cytotoxic effect of doxorubicin against MCF-7/S, MCF-7/Dox, A2780/S and A2780/Dox cells by 15, 13, 11 and 9%, respectively. These results point on the perspective of study of biological activity of callixarenes with specific sites for conjugation with specific antigens in vivo on the model of experimental animals as biologically active substances, able to modulate sensitivity of malignant tumor cells to antitumor drugs.

This study was supported by contract №2.2.5.319/2 of the "Novel medical-biological problems and human environment" program (2007-2009).

НЕЙРОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 2-ОКСОИНДОЛИН-3-ГЛИОКСИЛОВОЙ КИСЛОТЫ КАК ЗАКОНОМЕРНОЕ ЭВОЛЮЦИОННОЕ СВОЙСТВО СОЕДИНЕНИЙ ЭТОГО РЯДА

Луценко Р.В., Важничая Е.М.

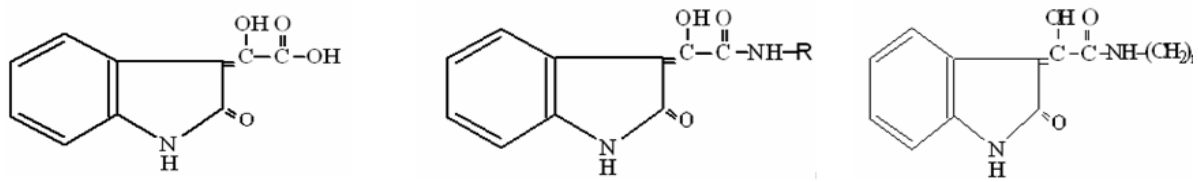
Высшее государственное учебное заведение Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия», Полтава, Украина, e-mail farmalu@mail.ru

В последнее время синтезированы и интенсивно изучаются производные 2-оксоиндолин-3-глиоксиловой кислоты [1]. Известно, что глиоксиловая кислота (1) участвует в цикле трикарбоновых кислот у низших организмов, поддерживая необходимый уровень щавелево-уксусной кислоты за счет реакций глиоксилатного шунта [2]. Оксоиндолы как метаболиты триптофана связаны с моноаминоергическими процессами в центральной нервной системе [3]. Это стало предпосылкой к изучению активности указанных биологически активных веществ (БАВ) и установлению у них антиоксидантного, антигипоксантного, кардиопротекторного и стресспротекторного действия [4].

Цель представленного исследования – изучить влияние производных 2-оксоиндолин-3-глиоксиловой кислоты на поведенческие реакции и двигательную активность животных в тесте «открытое поле». Скринингу подвергали 5 соединений в виде ацетамидов и бутирамидов (2) и 5 соединений в виде эфиров уксусной, масляной, ацетиламиноуксусной, ацетиламинопропионовой и ацетиламиномасляной кислот (3). Все использованные вещества липотропны и вводились белым крысам внутрибрюшинно в средних эффективных дозах в виде тонкодисперстной эмульсии. В качестве препаратов сравнения использовали нейролептик аминазин, анксиолитик диазепам и трициклический антидепресант имипрамин. Контролем служили интактные животные. В тесте «открытое поле» определяли латентный период до начала движения животного, количество пересеченных квадратов, выходов в центр поля, стоек и актов груминга.

Установлено, что 7 БАВ уменьшают количество пересеченных квадратов, 3 соединения не влияют на этот показатель и 1 прозводное из числа эфиров увеличивает его по сравнению с контролем. Все производные уменьшают количество стоек. 7 изученных БАВ уменьшают число актов груминга, в то время как остальные соединения увеличивают этот показатель. Изменения латентного периода менее закономерны. В проведенном тесте препарат сравнения аминазин наиболее сильно угнетает все двигательные и поведенческие реакции животных, что можно обозначить, как «++++», Пользуясь такой шкалой, угнетающее действие диазепама следует оценить, как «+++». Сравнение горизонтальной и вертикапьной дигательной активности позволяет выделить 2 амидных и 1 эфирное производное 2-оксоиндолин-3-глиоксиловой кислоты, которые по интенсивности подавления двигательной активности находятся на уровне диазепама. Действие этих соединений на тревожность (выходы в центр поля и груминг) также сопоставимо по выраженности с действием диазепама (+++ – ++++). В тоже время одно из производных ряда эфиров масляной кислоты увеличивает количество пересеченных квадратов и выходы в центр поля при слабом уменьшении числа стоек (+) и актов груминга (++), что подобно действию антидепрессанта имипрамина в данной ситуации.

Полученные данные позволяют предположить, что нейротропная активность производных 2-оксоиндолин-3-глиоксиловой кислоты является закономерной для этих БАВ и связана их ядерной структурой, тогда как характер и выраженность такой активности зависит от наличия эфирной или амидной связи и змещающих радикалов. Выявленные в ходе исследования соединения-лидеры являются перспективными для углубленного анализа их ингибирующего или стимулирующего влияния на центральную нервную систему с целью создания новых фармакологических препаратов.



1 2 3

Литература:

1. *Колісник С.В., Свечнікова О.М., Болотов В.В.* Ліпофільні властивості етилових естерів N-[(2-оксоіндоліден-3-2-оксіацетил] амінокислот, Вісник фармації, 2010, 1(61), С.19-22.
2. *Mathews C.K., Van Holde K.E., Ahern K.G. (eds).* Biochemistry, 3rd ed., Addisson Wersley Longman, San Francisco, 2000, 1186 p.
3. *Sirisoma N., Pervin A., Drewe J., Tseng B., Cai S.X.* Discovery of substituted N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)benzohydrazides as new apoptosis inducers using a cell- and caspase-based HTS assay, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009, Vol.19 (10), P.:2710-2713.
4. *Луценко Р.В., Дев'яткіна Т.О., Важнича О.М., Болотов В.В., Колісник С.В.* Пошук біологічно-активних речовин зі стреспротективною активністю в ряду нових похідних 2-оксоіндолін-3-гліоксилової кислоти, Вісник фармації,. 2007, №3 (51), С. 67-69.

NEUROTROPIC ACTIVITY OF 2-OXOINDOLIN-3-GLYOXILIC ACID DERIVATIVES AS REGUILAR EVOLUTION PROPERTY OF THIS LINE COMPOUNDS

Lutsenko R.V., Vazhnichaya Ye.M.

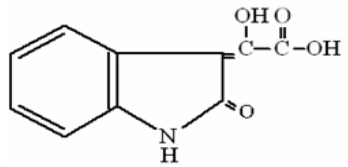
Higher State Educational Establishment of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy",
Poltava, Ukraine
e-mail farmalu@mail.ru

Derivatives of 2-oxoindolin-3-glyoxilic acid are synthesized recently and are intensively studied [1]. It is known, that glyoxilic acid (1) participates in a cycle of tricarboxylic acids in primitive organisms, supporting a necessary level of oxalacetic acid due to reactions of glyoxilate shunt [2]. Oxoindols as tripthophane metabolites are connected with monoaminoergic processes in the central nervous system [3]. It became the precondition to studying activity of specified biologically active substances (BAS) and discovering of antioxidant, antihypoxic, cardioprotective and stressprotective effects at them [4].

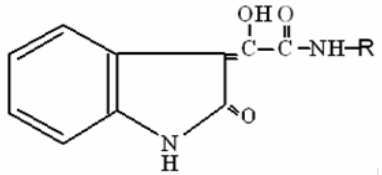
The purpose of the represented research is to study the influence of 2-oxoindolin-3-glyoxilic acid derivatives on behavioral reactions and motor activity of animals in the test of "an open field". 5 compounds as acetamides or butyramides (2) and 5 compounds as ethers of acetic, butyric, acetylaminoacetic, acetylaminopropionic or acetylaminobutyric acids (3) were subjected to screening. All used substances are lipophilic and were administered to albino rats intraperitoneally in average effective doses as very dispersive emulsions. As reference preparations it was used chlorpromazine (neuroleptic), diazepam (anxiolytic) and imipramine (tricyclic antidepressant). Intact animals served as a control. In "an open field" test, it was determined the amount of crossed squares, exits to the center of a field, stands, and grooming procedures as well as the latent period prior to the start of animal's movement.

It is shown, that 7 BAS reduce the amount of crossed squares, 3 compounds do not influence this parameter and 1 derivative from ethers line increases it in a comparison with a control. All derivatives reduce the number of stands. The 7 of investigated BAS reduce the amount of grooming procedures while other compounds increase this parameter. Changes of the latent period are less regular. In the carried out test, reference preparation chlorpromazine most strongly inhibits all motor and behavioral reactions of animals that it is possible to designate, as "++++", Using such scale, diazepams' inhibiting action should be estimated, as "+++". Comparison of BASs' action on horizontal and vertical motor activity makes it possible to select 2 amide and 1 ether derivatives of 2-oxoindolin-3-glyoxilic acid which are at a level of diazepam on their intensity of motor activity inhibition. Action of the same compounds on anxiety (exits to the center of a field and grooming) also is comparable on expressiveness to diazepam's effect (+++ - ++++). At the same time, one of the derivatives from butyric acid ethers increases the amount of crossed squares and exits to the center of a field at weak reduction of number of stands (+) and grooming procedures (++), that is similar to the action of antidepressant imipramine in the given situation.

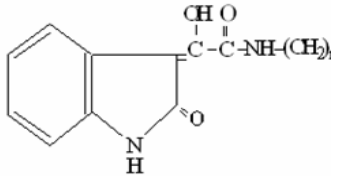
The data obtained make it possible to conclude, that neurotropic activity of 2-oxoindolin-3-glyoxilic acid derivatives is natural for these BAS and is connected with their nuclear structure whereas character and expressiveness of such activity depends on the presence of ester or amide bonds and substitutive radicals. The leading compounds revealed during research are perspective for profound analysis of their inhibiting or stimulating influence on the central nervous system with the purpose of creation of new pharmacological preparations.



1



2



3

References:

1. *Колісник С.В., Свечнікова О.М., Болотов В.В.* Ліпофільні властивості етилових естерів N-[(2-оксоіндоліден-3-2-оксіацетил] амінокислот, Вісник фармації, 2010, 1(61), С.19-22.
2. *Mathews C.K., Van Holde K.E., Ahern K.G. (eds).* Biochemistry, 3rd ed., Addisson Wersley Longman, San Francisco, 2000, 1186 p.
3. *Sirisoma N., Pervin A., Drewe J., Tseng B., Cai S.X.* Discovery of substituted N'-(2-oxoindolin-3-ylidene)benzohydrazides as new apoptosis inducers using a cell- and caspase-based HTS assay, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009, Vol.19 (10), P.:2710-2713.
4. *Луценко Р.В., Дев'яткіна Т.О., Важнича О.М., Болотов В.В., Колісник С.В.* Пошук біологічно-активних речовин зі стреспротективною активністю в ряду нових похідних 2-оксоіндолін-3-гліоксилової кислоти, Вісник фармації,. 2007, №3 (51), С. 67-69.

ОСОБЛИВОСТІ ПОЯВИ ДЕСТРУКТИВНИХ ЗМІН В КЛІТИННИХ УТВОРЕННЯХ ЦЕРЕБРОКОРТЕКСУ ССАВЦІВ ТА ЦИТОПРОТЕКТОРНА ДІЯ «ЦЕРЕБРАЛУ» НА НЕЙРОНИ ТА ГЛІОЦИТИ ЦЕРЕБРОКОРТЕКСУ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ГОСТРОГО АУТОГЕМОРАГІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

Макаренко О.М., Єфремова В.А.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail: 5_verochka@mail.ru

Згідно даних всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) гострий інсульт посідає третє місце серед основних причин смертності населення багатьох високорозвинених країн. За цим показником він поступається лише кардіоваскулярним та онкологічним захворюванням. При геморагічному інсульті (ГІ) виникають порушення та наслідки, що є надзвичайно тяжкими. Про це свідчить, наприклад, висока смертність у 50-60% хворих із ГІ та розвиток повторного інсульту (у 20% хворих) протягом першого півріччя після розвитку ГІ [1].

Результати попередніх досліджень свідчать, що при моделюванні гострого ГІ спостерігається розвиток нейроморфологічних порушень: поява перицелюлярних та периваскулярних набряків; зморщування окремих груп нейронів із одночасною гіпертрофією інших; варикозних розширень; валлерівської дегенерації (різний ступінь деструкції мієліну в оболонках нервів) [2].

Метою нашого дослідження стало вивчення особливостей розвитку дегенеративно-деструктивних змін у цереброкортексі головного мозку статевозрілих кішок та фармакопротекторної дії трофінотропіну «Церебралу» на нервові клітини сенсо-моторної ділянки цереброкортексу за умов моделювання аутогеморагічного інсульту.

Досліди були проведені на 20 статевозрілих кішках (11 самцях і 9 самках) вагою 1,85-3,2 кг, у яких в умовах тіопентал-натрієвого наркозу (60 мг/кг, внутрішньоочеревинно) моделювали гострий ГІ із використанням стереотаксичного методу [3]. У постопераційному періоді частині тварин вводився трофінотропін «Церебрал» (0,1 мг/кг, інтраназально). На першу та десяту добу після моделювання церебро-васкулярної патології для гістологічних досліджень відбирались ділянки сенсо-моторної кори великих півкуль головного мозку тварин та фарбувались гематоксиліном та еозином або толуїдиновим синім.

Отримані результати досліджень нервової тканини при гострому ГІ свідчать про розвиток різких змін у нейронах, та у гліальних клітинах, що можуть набувати дистрофічного характеру. Спостерігається зростання осміофілії структур цитоплазми та ядра, гіпертрофія пірамідних нейронів третього ($S_{кл}$=64.977,0 мкм) та п'ятого ($S_{кл}$=132.3020 мкм) шарів цереброкортексу було встановлено що, характерним проявом деструктивних змін нервової тканини при відтворенні гострого ГІ слід вважати розвиток сателітозу. Це проявляється у збільшенні нейрогліального індексу (НГІ) до 1.1 у третьому та 1.75 у п'ятому шарі цереброкортексу на 10-й день моделювання цереброваскулярної патології. Одночасно з цим зростає і кількість астроцитів, які контактують із капілярами, відзначається гіпертрофія, зокрема, ядер і відростків цих клітин. Встановлено, що нейронопротекторна дія «Церебралу» доповнюється вираженими гліопротекторними ефектами.

Література

1. *В.И. Скворцова, В. И. Крылов,* Геморрагический инсульт: Практическое руководство, М.: Гэотар-медиа, 2005, С. 65-72.
2. *Е. И. Гусев, А. Н. Коновалов, Г. С. Бурд.* Неврология. – М.: Медицина, 2000, С.259-267.
3. *А. Н. Макаренко и соавт.*, Журнал высшей нервной деятельности, М., 2002, том №52, №6, С.265-268.

FEATURES OF THE DESTRUCTIVE CHANGES IN THE CELLULAR CEREBROCORTEX FORMATIONS IN MAMMALS AND CYTOPROTECTIVE EFFECT OF "CEREBRAL" TO THE NEURONS AND GLIOCYTES OF CEREBROCORTEX IN ACUTE AUTOGEMORRHAGIC INSULT MODELING

Makarenko O.M., Efremova V.A.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine
e-mail: 5_verochka@mail.ru

According to the data, given by the World Health Organization (WHO), acute insult has the third place among the mayor causes of death in the highly developed countries. It yields only cardiovascular and oncologic disease. Hemorrhagic stroke (GS) causes the violation and the disorders that are extremely severe. High mortality in 50-60% of patients with GS and stroke re-development (20% of patients) during the first six months after the GS confirms with it[1].

Results of previous studies in modeling the acute GS neuromorphologic disorders development shows that it was found the emergence and perivascular edema pericytial, creasing specific groups of neurons with simultaneous hypertrophy of others, varicose extensions, vallery degeneration (varying myelin destruction degree in the nerve membranes) [2].

The aim of our research was to study the features of degenerative-destructive changes in matureture cats brain cerebrocortex and farmakoprotective effect of the "Cerebral" trophinotropine to the neurons of the sesomotor areas in cerebrokortex in the autohemorrhagical stroke modelling.

Experiments were conducted on 20 mature cats (11 males and 9 females) 1,85-3,2 kg weight. The acute GS was stimulated using stereotaxis with thiopental sodium anesthesia (60 mg / kg intraperitoneally)[3]. The part of the animals was treated by "Cerebral" trofinotropin (0,1 mg / kg, intranasal) in the postoperative period. The areas in the sensomotor cortex were selected for histological studies on the first and tenth day after cerebrovascular pathology modeling. This material was stained by hematoxylin and eosin or by toluidine blue.

The results of our nervous tissue studying in acute GI shows the development of substantial changes in neurons and in glial cells that can acquire dystrophic character. Osmiophylity of cytoplasmic and nucleus structures was growing, hypertrophy of pyramidal neurons in the third (SkI = 64.977,0 m) and fifth (SkI = 132.3020 mm) cerebrocortex layers were observed. It was found that the typical manifestation of destructive changes in nerve tissue in acute GS runtime should be considered sathelitosis development . This is reflected in the neuroglial index (NGI)increase to 1.1 in the third and 1.75 in the fifth cerebrocortex layer in the 10-th day of cerebrovascular disease modelling. At the same time the number of astrocytes that contacts with capillaries increases, hypertrophy in nuclei and fibers was observed. It was established that neuronoprotektive "Cerebral"action is supplemented with powerful glioprotektive effects.

References:

1.*В.И. Скворцова, В. И. Крылов* Геморрагический инсульт: Практическое руководство, М.: Гэотар-медиа, 2005, С. 65-72.
2.*Е. И. Гусев, А. Н. Коновалов, Г. С. Бурд*. Неврология. – М.: Медицина, 2000, С.259-267.
3.*А. Н. Макаренко и соавт.*, Журнал высшей нервной деятельности, М., 2002, том №52, №6, С.265-268.

СТРУКТУРНИЙ СТАН КЛІТИННИХ МЕМБРАН ЕНТЕРОЦИТІВ ТОНКОЇ КИШКИ ЗА ДІЇ ЕКЗОГЕННИХ ЧИННИКІВ ТА КОРЕКЦІЇ БАД FLP-MD

[1]Мельничук Д.О., [2]Хижняк С.В., [1]Грищенко В.А., [2]Степанова Л.І., [2]Прохорова А.О., Войцицький В.М.

[1]Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, Україна
[2]Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail: hsv@univ.kiev.ua

В основі багатьох патологічних процесів лежать структурно-функціональні порушення клітинних мембран, які забезпечують життєво важливі функції клітин. Різноманітний арсенал медикаментозних засобів недостатньо орієнтований на відновлення їх структури та функцій.

Створено лікувальний засіб на основі фосфоліпідів тваринного походження, а саме із маслянки (побічного продукту переробки молока на масло) – БАД FLP-MD. До складу ліпосомальної форми БАД FLP-MD входять фосфоліпіди (фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин, сфінгомієлін, фосфатидилінозитол), а також комплекс ненасичених жирних кислот (переважно ліноленова, лінолева, олеїнова) та жиророзчинні вітаміни (α-токоферол і ретинолу ацетат). Цей препарат є природним для організму ссавців і має відновлюючу ефективність при структурно-функціональних розладах клітинних мембран, як показано за розвитку запальних і дистрофічних процесів у тканинах при захворюваннях шлунково-кишкового тракту. Крім того, дослідження *in vitro* взаємодії БАД FLP-MD з ліпідними моношаровими та бішаровими ліпідними мембранами показали, що препарат проявляє поверхневу та мембранотропну дію. Метою даної роботи є встановлення можливості використання БАД FLP-MD для стабілізації клітинних мембран при дії різних фізичних та хімічних чинників на організм.

Експериментальна модель – 1) тотальне рентгенівське опромінення тварин (щури) в дозі 2 Гр, а також введення БАД FLP-MD (14,0 мг/кг на день) кожного дня (5 днів), 2) пероральне надходження $CdCl_2$ (1,0 мг Cd/кг, 1/50 $ЛД_{50}$) кожного дня протягом 14 діб окремо чи на тлі введення БАД FLP-MD (14,0 мг/кг на день). Структурний стан внутрішніх мембран мітохондрій ентероцитів тонкої кишки оцінювали методом флуоресцентних зондів, із використанням пірену (локалізуєтся в області жирнокислотних ланцюгів фосфоліпідів) та поверхневого мембранозв'язаного 1,8-анілінонафталінсульфоната (АНС). Розділення мембранних фосфоліпідів (ФЛ) проводили методом тонкошарової хроматографії. Оцінювали показники ПОЛ та активність антиоксидантних ферментів.

Виявлено різнобічні зміни структурної впорядкованості ліпідної компоненти та конформаційну модифікацію білкових молекул мембран мітохондрій ентероцитів тонкої кишки в умовах дії екзогенних чинників. Це стосується зростання мікров'язкості мембранних ліпідів (аннулярних та загальної ліпідної фази), конформаційної модифікації мембранних білків, зміни в їхній топографії, порушення гідрофобних протеїн-ліпідних взаємодій, а також структурних перебудов поверхневого мембранного шару. За умов введення тваринам БАД FLP-MD перед опроміненням чи на тлі надходження кадмію досліджувані показників структурного стану мембран не відрізняються від контрольних значень.

Дія кадмію чи рентгенівське опромінення призводить до змін у вмісті ліпідів в мембранах ентероцитів, а саме загальних ліпідів, холестеролу, фосфоліпідів, перерозподілу у вмісті окремих фосфоліпідів, накопиченню лізоформ фосфоліпідів. За цих умов до структурних порушень мембран призводить і їх окисна модифікація. Встановлено накопичення продуктів ПОЛ та зниження активності супероксиддисмутази, каталази, ферментів глутатіонової системи захисту. Застосування щурам ліпосомальної форми БАД FLP-MD запобігає активації в ентероцитах вільнорадикальних процесів та стимулює антиоксидантні процеси. Дія БАД FLP-MD проявляється також у стабілізації в мембранах на контрольному рівні вмісту фосфоліпідів, однак не холестеролу, за дії досліджуваних чинників.

Таким чином, використання ліпосомальної форми БАД FLP-MD в умовах опромінення чи надходження до організму кадмію приводить до стабілізації структурних властивостей мембран ентероцитів. Враховуючи, що основною компонентою БАД FLP-MD є фосфоліпіди, які за своїм жирнокислотним складом відповідають мембранним фосфоліпідам тканин ссавців та містять природні моно- і поліненасичені жирні кислоти, цей препарат проявляє мембрано-стабілізуючий ефект, що може бути використано в лікувально-профілактичних цілях.

THE STRUCTURAL STATE OF MEMBRANES OF SMALL INTESTINE ENTEROCYTES AT THE INFLUENCE OF EXOGENOUS FACTORS AND THE CORRECTION UNDER USING OF BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITIVE FLP-MD

[1]Melnytchuk D.O., [2]Khyzhnyak S.V., [1]Gryshchenko V.A., [2]Stepanova L.I., [2]Prokchorova A.V., Voitsitsky V.M.

[1]National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
[2]Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine
e-mail: hsv@univ.kiev.ua

The structural and functional changes of cellular membranes that support the vital functions of the cells are assumed as asis of most pathological states The versatile arsenal of medicamentous means is not sufficient for the regeneration of the structure and functions of membranes.

The medicinal agent based on the phospholipids of animal origin, notably from the by-product of processing of milk to butter (buttermilk) – biologically active additive (BAA) FLP-MD – has been developed. The liposomal form of BAA FLP-MD contains phospholipids (phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, sphingomyelin, phosphatidyl inositol), the complex of unsaturated fatty acids (mainly linolenic acid, linoleic acid, oleic acid) and liposoluble vitamins (α- tocopherol and retinol acetate). This preparation is natural for the mammals organism and has the regenerative efficacy at the structural and functional disturbances of cellular membrane as was shown at the development of inflammatory and dystrophic processes in tissues following the diseases of gastrointestinal tract. Moreover, in the investigations of the interaction of BAA FLP-MD with lipid mono- and bilayer membranes it was shown that the preparation displays the superficial and membranotropic action. The aim of the study is the estimation of possibility of the use of BAA FLP-MD for cellular membranes stabilization at the influence of different physical and chemical factors on the organism.

The experimental model on rats – 1) total X-ray exposure to radiation in the dose 2 Gy, and the administration of BAA FLP-MD (14,0 mg/kg daily) during 5 days; 2) the peroral inflow of $CdCl_2$ in the daily dose 1,0 mg Cd/kg during 14 days (1/50 LD_{50}) separately or on the administration of BAA FLP-MD (in the daily dose 14,0 mg/kg).). The structural state of inner mitochondrial membranes (MM) was evaluated with the method of fluorescent probes using pyrene (localizes in the region of fatty-acid chains of phospholipids) and surface membrane-bounded 1,8 – anilinonaphtalensulfonate (ANS). The separation of membrane phospholipids (PL) was performed using thin-layer chromatography. The indices of lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes were evaluated.

The versatile changes of structural order of lipid component and conformational modification of protein molecules of mitochondrial membranes from small intestine enterocytes are observed at the influence of exogenous factors. These changes include the increase of microviscosity of membrane lipids (annular lipids and total lipid phase), the conformational modification of membrane proteins, the changes in the topography of them, the disturbances of hydrophobic protein-lipid interactions and the structural rearrangements of superficial membrane layer. At the administration of BAA FLP-MD to animals before irradiation or on the background of cadmium inflow the values of investigated indices don't differ from the control values.

It was shown that the action of cadmium leads to the changes of the lipid contents in the membranes of enterocytes, notably total lipids, cholesterol and phospholipids content, to the redistribution in the content of individual phospholipids, to the accumulation of lysoforms of the latter. At these conditions the structural derangements of membranes could be caused by the oxidative modification of them. The accumulation of lipid peroxidation and the decrease of superoxide dismutase, catalase and glutathione-dependent enzyme activity are demonstrated. The administration of liposomal form of BAA FLP-MD to rats prevents the activation of the free radical processes in cells and stimulates the antioxidant processes. BAA FLP-MD displays the stabilizing action on the PL content, but not cholesterol content, in the membranes at the influence of investigated factors relatively to the control level.

Thus, the use of liposomal form of BAA FLP-MD at the conditions of irradiation or cadmium inflow leads to the stabilization of structural properties of membranes of enterocytes. Taking into account that the main component of BAA FLP-MD are phospholipids the fatty-acid composition of which demonstrates the similarity to the membrane phospholipids of mammal tissues. This preparation displays the membrane-stabilizing effect due to the natural mono- and polyunsaturated fatty acids in the composition that could be used in medical and prophylactic aims.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КАТАЛАЗЫ *PENICILLIUM PICEUM* БИМ F-371 Д В АГАРИЗОВАННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И УЧЕТА КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

[1]Михайлова Р.В., [1]Мороз И.В., [2]Ермакова Т.С.

[1]Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: enzyme@mbio.bas-net.by, irmorz@gmail.com
[2]РНПЦ эпидемиология и микробиология, Минск, Беларусь

Фермент класса оксидоредуктаз – каталаза (КФ 1.11.1.6) катализирует реакцию разложения пероксида водорода до молекулярного кислорода и воды. Фермент применяется в различных технологиях легкой, химической, пищевой промышленности и медицине.

Одним из важных направлений применения каталазы является клиническая диагностика. Известно, что при попадании в неблагоприятные условия многие микроорганизмы, в том числе и патогенные, способны переходить в покоящееся состояние, оставаясь при этом жизнеспособными. Это состояние характеризуется снижением метаболической активности и полным отсутствием деления. При диагностике возбудителей инфекционных заболеваний, выделяемых из клинического материала и природных источников, пребывание микроорганизмов в состоянии покоя может приводить к ошибкам при их количественном учете. В литературе представлены данные, что введение каталазы в питательные селективные и неселективные агаризованные среды обеспечивает повышение детекции (в 12-465 раз) таких микроорганизмов как *Staphylococcus aureus*, представителей рода *Clostridium*, различных штаммов *Escherichia coli, Neisseria gonorrhoeae* и др.

Ранее нами получен продуцент внеклеточной каталазы *Penicillium piceum* БИМ F-371 Д [1], оптимизирован состав питательной среды и условия культивирования гриба [2], разработаны методы получения ферментного препарата различной степени очистки [3]. Цель данной работы – изучение возможности использования каталазы *P. piceum* БИМ F-371 Д в агаризованных питательных средах для обнаружения и учета патогенов – представителей семейства *Enterobacteriaceae* и семейства *Staphylococcaceae*.

Для получения препарата каталазы проводили ультрафильтрационное концентрирование фильтрата культуральной жидкости *P. piceum* БИМ F-371 Д на мембранном фильтре с радиальным перемешиванием с использованием мембраны ПА-20. Ферментный препарат вводили в питательную среду в дозе 1000 ед на чашку Петри.

В работе использовали клинически значимые микроорганизмы – *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, выделенные у пациентов с заболеваниями различной этиологии. Хранение культур проводили параллельно при +5°C (контроль) и в замороженном состоянии при -20°C (опыт). Для посева на питательные среды использованы бактериальные суспезии в изотоническом растворе. Концентрацию микроорганизмов в суспензии определяли по оптическому стандарту мутности. Приготовленный инокулят равномерно распределяли по поверхности агара. Штаммы микроорганизмов культивировали в течение 24 ч на селективных питательных средах – среде Эндо (*E. coli*) и желточно-солевом агаре (ЖСА, *S. aureus*).

Через 24 ч инкубации при 37°C было отмечено, что все выросшие колонии были типичными для соответствующего вида микроорганизмов. Установлено, что на среде Эндо с каталазой количество выросших колоний *E. coli* превышает число колоний на обычной селективной среде в 1,79 раза при использовании инокулята, хранившегося при +5°C, и в 2,11 раза при посеве инокулятом, хранившимся при -20°C. Аналогичные результаты получены и для *S. aureus* – на среде ЖСА с добавлением каталазы выросло в 1,22 раза больше колоний в контрольном варианте и в 1,63 раза в опытном. При этом количество колоний *E. coli* на среде Эндо при применении инокулята, хранившегося при +5°C, превысило в 2,49 раза число выросших колоний при посеве инокулятом, хранившимся в замороженном состоянии. При введении в селективную среду каталазы количество обнаруженных колоний в контрольном варианте превысило количество колоний *E. coli*, полученных при использовании посевного материала, хранившегося при -20°C, в 2,10 раза. Что касается *S. aureus,* на ЖСА количество колоний в опыте и в контроле отличалось в 3,5 раза, а при введении в среду каталазы – в 2,61 раза.

Результаты выполненных исследований свидетельствуют о том, что использование посевного материала, хранившегося в замороженном состоянии, приводит к снижению числа колоний *E. coli* и *S. aureus*, выросших на селективных питательных средах с каталазой в меньшей мере, чем на средах без фермента. Введение в питательные среды каталазы обеспечивает увеличение количества обнаруживаемых колоний исследуемых патогенов при использовании посевного материала, хранившегося как при +5°C, так и при -20°C. Таким образом, экспериментально доказана эффективность использования каталазы *P. piceum* БИМ F-371 Д в агаризованных питательных средах для обнаружения и учета патогенных микроорганизмов – *E. coli* и *S. aureus*.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БРФФИ (проект № Б10РА-006).

Литература:

1. *Ж.И. Павловская, И.В. Мороз, Р.В. Михайлова, А.Г. Лобанок* // Матер. Междунар. научн. конф. «От классических методов генетики и селекции к ДНК-технологиям». – Гомель, 2007, с. 116-117.
2. *И.В. Мороз, А.Н. Еремин, Р.В. Михайлова, А.Г. Лобанок* // Докл. НАН Беларуси, 2009 г., т. 53, № 4, с.77-81.
3. *Р.В. Михайлова, И.В. Мороз* // Матер. Междунар. научн.-техн. конф. "Новейшие достижения в области импортозамещения в химической промышленности и производстве строительных материалов". – Минск, 2009, ч.2, с. 52-55.

INVESTIGATION OF POSSIBLE APPLICATION OF CATALASE FROM *PENICILLIUM PICEUM* BIM F-371 D ON AGAR NUTRIENT MEDIA FOR DETECTION AND MONITORING OF CLINICALLY SIGNIFICANT PATHOGENIC MICROORGANISMS

[1]Mikhailova R.V., [1]Moroz I.V., [2]Yermakova T.S.

[1]Institute of Microbiology Belarus National Academy of Sciences, Minsk, Belarus
e-mail: enzyme@mbio.bas-net.by, irmorz@gmail.com
[2] Republican Scientific Practical Centre for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus

The enzyme catalase (EC 1.11.1.6) referred to oxidoreductases catalyzes the reaction of hydrogen peroxide decomposition to molecular oxygen and water. The enzyme is applied in divers processes of light, chemical, food industry and medicine.

One of vital trends in catalase application is a clinical diagnostics. It is known that many microorganisms, including pathogenic species, when exposed to adverse conditions are able to make transition into resting state without loss of viability. This state is characterized by decreased of metabolic activity and total lack of cell division. In diagnostics of infections pathogens isolated clinical samples and and natural sources resting microorganisms may lead to errors in their quantitative evaluation. Literature reports indicate that supply of catalase into selective and non-selective agar media increased detection rate (by 12-465 times) of such microorganisms as *Starhylococcus aureus*, representatives of *Clostridium* genus, various strains of *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, etc.

Earlier we selected strain *Penicillium piceum* BIM F-371 D –producer of extracellular catalase [1], optimized composition of nutrient medium and cultural conditions [2], developed recovery methods of enzyme with different purity grade [3]. Aim of this paper is to study possibility of using catalase of *P. piceum* BIM F-371 D in agar nutrient media for the detection and monitoring of pathogens representing family *Enterobacteriaceae* family and *Staphylococcaceae*.

To derive catalase preparation cultural filtrate of *P. piceum* BIM F-371 D was concentrated by ultrafiltration technique on membrane filter PA-20 with radial agitation. The enzyme was added to the nutrient medium at dose of 1000 U per Petri plate.

Clinically significant microorganisms *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from patients suffering from diseases of divers etiology were chosen for further experiments. Cultures were main tainted in parallel at +5°C (control) and in frozen state at -20°C (experiences). Bacterial suspension in isotonic solution were applied for inoculation of nutrient media. Microbial concentration in the suspension were evaluated via optical turbidity. The prepared inoculum was evenly spread on the agar surface. Microbial strains were cultured during 24 h on selective nutrient media – Endo medium (for *E. coli*) and yolk mineral agar (YMA for *S. aureus*).

After 24 h of incubation at 37°C it was reconded that all grown colonies proved typical for the respective microbial species. It was found that on Endo medium with catalase number of grown *E. coli* colonies exceeded that on normal selective medium by 1.79 times, using inoculum stored at +5°C, and by 2.11 times in case of inoculation by the material preserved at -20°C. Similar results were obtained for *S. aureus* – supply of catalase intu YMA medium raised the number of colonies in control by 1.22 times and in experimental variant by 1.63 times. Number of *E. coli* colonies on Endo medium grown from inoculum stored at +5°C exceeded 2.49-fold the respective figure derived from inoculum preserved in frozenn state. Feeding catalase into selective medium number of detected colonies in control variant exceeded number of *E. coli* colonies resulting from application of inoculum maintained at -20°C by 2.10 times. As to With *S. aureus*, number of colonies on YMA differed 3.50-fold in experiment and controls, while in case of of catalase addition the difference was 2.61 times.

Results of completed investigations indicate that application of inoculum stored in frozen state leads to reduction in number of *E. coli* and *S. aureus* colonies grown on selective medium with catalase lesser extent than on media without the enzyme. Introduction of catalase into nutrient media ensures increased number of pathogenic colonies using seed material maintained both at +5°C and -20°C. Summing up, efficiency of *P. piceum* BIM F-371 D catalase application in agar nutrient media for detection and monitoring of pathogenic microorganisms *E. coli* and *S. aureus* was experimentally confirmed.

This work was financially supported by grant of Belarusian National Foundation of Basic Research (project number B10RA-006).

***Литература*:**

1.*Zh.I. Pavlovskaya, I.V. Moroz, R.V. Mikhailova, A.G. Lobanok* // Proc. Int. conf. «From conventional genetic and selection methods to DNA technologies». – Gomel, 2007, p. 116-117.
2.I.*V. Moroz, A.N. Eremin, R.V. Mikhailova, A.G. Lobanok* // Doklady NAN Belarusi, 2009, vol. 53, № 4, p. 77-81.
3.*R.V. Mikhailova, I.V. Moroz* // Proc. Int. conf. "New advances in import substitution in the chemical industry and building materials". – Minsk, 2009, vol. 2, p. 52-55.

ВОЗМОЖНОСТИ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА БИОИНДИКАЦИИ НА КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Михайлова Л.П.

НЦ клинической и экспериментальной медицины Сибирского отделения РАМН, Новосибирск, Россия
e-mail: jumikh3@mail.ru

В настоящее время, в период стремительно развивающихся техногенных ,в широком смысле антропогенных загрязнений всего и всякого, в том числе рабочих мест и мест проживания населения. Особенно остро встают вопросы комплексного изучения экологии окружающей среды, первичной профилактики и лечения. Одним из путей подходов - это разработка и обоснования биоиндикации. Возникает вопрос ЧТО ТАКОЕ БИОИНДИКАЦИЯ и почему ее надо применять. Биоиндикация – это обнаружение биологически значимых антропогенных нагрузок на основ реакции на них живых организмов и их сообществ – все это относится в полной мере ко всем видам антропогенных нагрузок от экологических, фармокологических средств, воздействующих на клетку , а также и на человека. Преимущество биоиндикаторов, особенно млекопитающих, состоит в том, что механизм обменных процессов у них близок к таковому у человека и здесь возможны корреляции.

Поскольку мой текст заявлен по теме «Возможности и области применения метода биоиндикации», то я кратко коснусь того, что нами проведено за эти годы. Было исследовано несколько лечебных препаратов на токсичность безопасность применения (Австрия, С.Петербург, и наша сибирская смолка в различных видах, изготовление препаратов Капилар и др.)

Главное преимущество культивируемых клеток , которое полностью используется клеточными биологами, это возможность прижизненного наблюдения клеток с помощью микроскопа. Существенно, что при работе с культурами клеток в эксперименте используются здоровые клетки и что они сохраняют жизнеспособность в течении всего эксперимента. Убедиться в этом можно периодически тестируя культуру клеток. более того , легко оценивать относительное содержание жизнеспособных клеток. при опыте же на целом животном состояние почек, например, можно оценить лишь в конце эксперимента, и к тому же лишь качественно.

Если каждую клетку рассматривать как независимый объект эксперимента, то одна культура на покровном стекле даст достоверный ответ. Это является важным преимуществом, когда дело касается человека.

При использовании клеточных культур, как правило, бывает нетрудно установить, что при такой-то концентрации добавленное в культуру вещество находится в контакте с клетками в течении данного периода времени. Это обеспечивает получение реальных значений скорости включения или метаболизма исследуемых соединений

В наших экспериментах модель биоиндикации используется как экспресс-метод. Определить цитотоксичность агента значит оценить его способность убивать клетки или изменять резко их метаболизм.

Ряд методов определения цитотоксичности был разработан для отбора лекарственных средств, что и использовано нами при отборе протекторов , пищевых добавок. Нашими работами ранее было установлено, что применение метода биоиндикации в фармоэкологических и т.п. исследованиях, дает возможность изучить фармакологические препараты, адаптогены, антиоксииданты, биологические активные вещества, в том числе мед.

Исследования вышеуказанных объектов производится на цитотоксичность, на их биологическую активность, по следующим тестам: Плотность роста монослоя – СР, Подсчет митозов – МА%, Деление клеток, общий белок

Нами проведена серия исследования по медам Алтая, где задачей являлось определения качества меда, его активное воздействие на клеточную культуру и возможность применения (или выбор) такого меда, который обладает лечебными или активными свойствами. Были представлены меды с пяти пасек. Они были взяты с различных мест и упор был сделан не только на то, что растет вокруг пасеки, но и какой водный источник.

Так, 1. проба меда пасеки (№1), расположенной неподалеку от быстро текущей воды (р.Катунь)

2. Пасека (проба №2) расположена рядом с артезианским колодцем

3. Пасеки (пробы № 3, 4, 5) располагались неподалеку с ручьем, дающим спокойную водную поверхность.

При исследовании было получено по пп. 1, 2:клетки жизнеспособны, но растут на уровне контрольных, к которым мед не добавлялся. Деление клеток также на уровне контрольных, т.е. такой мед не подействовал активно на рост и деление клеток, хотя мед органолептически превосходен – душистый, пластичен и т.д. Пробы с пасек 3, 4, 5 дали удивительные результаты: клеток на 20 – 30% больше, чем в контроле. деление клеток высокое , клетки блестящие, крупные, с большими ядрами, идет синтез белка. Жизнеспособность клеток увеличивается до 9 суток, такой мед , по видимому, может быть лечебным. К сожалению, в то время нам не удалось провести исследования композиций различных трав, веществ совместно составленных с медом.

При исследовании нескольких проб меда получен результат - активность меда , его лечебные качества зависят не только от растений с которых собирается пыльца, образующие мед, но и от качества воды. Необходимо, чтобы источник воды представлял собой спокойную водную поверхность, По всей вероятности здесь играет и воздействие космических факторов особенно солнечная активность. В дальн5ейших клинических исследованиях так и оказалось, что такой мед является лечебным.

Заключение Подводя итог сказанному – метод биоиндикации с использованием клеточных культур с успехом может заменить опыт на лабораторных животных по нижеследующим причинам.

1. Дешевизна и доступность

2. Быстрое получение результатов и возможность прижизненного наблюдения за моделью в течении всего эксперимента.

3. Высокая корреляция результатов IN VITRO и IN VIVO

4. Полученные линии сохраняют высокую видовую, органную, и тканевую специфичность.

Этот метод может использоваться в экологии, фармокологии, и токсикологии

CELL POSSIBILITY AND SCOPE OF THE METHOD BIOINDICATION ON CULTURES OF HUMAN AND ANIMAL

Mikhailova L.P.

Research Centre for Clinical and Experimental Medicine, Siberian Branch of RAMS, Novosibirsk, Russia
e-mail: jumikh3@mail.ru

Now, during promptly developing technogenic, anthropogenous pollution of all and everyone, including workplaces and seats of residing of the population. Especially sharply there are questions of complex studying of ecology of an environment, primary preventive maintenance and treatment.

One of ways of approaches is a development and backgrounds of bioindication. There is a question THAT SUCH BIOINDICATION and why it should be applied.

Bioindication is a tracking down of biologically meaningful anthropogenous loads on bases of reaction to them of alive organisms and their communities – all this concerns to the full to all types of anthropogenous loads from ecological, pharmacological the means influencing a cell, together with for the person.

Advantage of bioindicators, especially mammal, consists that the mechanism of exchange processes at them is close to those at the person here again correlations are possible.

As my text is declared on subject matter « to the Possibility and a scope of a method of bioindication » I shall briefly concern that is lead by us for these years.

Medical preparations on toxicity a security of application (Austria, by S.Peterburg, and our Siberian campion in various types, manufacturing of preparations Capilar, etc.) have been investigated some

The main advantage of cultivated cells which is completely used by cellular biologists,

It is a possibility of lifetime supervision of cells by means of a microscope. It is essential, that at work on cultures of cells in experiment healthy cells are used and that they keep viability in current of all experiment. To make sure in it it is possible at regular intervals testing culture of cells.

Moreover, it is easy to estimate a relative content of viable cells. At experience on the whole animal the condition of kidneys, for example, can be estimated only in the end of experiment, and besides it is only qualitative.

If each cell to consider as independent object of experiment one culture on integumentary glass will give the authentic answer.

It is the important advantage when business concerns the person.

At use of cellular cultures, as a rule, happens easy to establish, that at such concentration the substance added in culture contacts cells in current of the given period of time.

It provides reception of actual values of speed of inclusion or a metabolism of investigated connections

In our experiments the model of bioindication is used as the express train-method. To define cytotoxicity the agent means to estimate its capacity to kill cells or to change sharply their metabolism.

A number of methods of definition cytotoxicity has been developed for selection of medical products, as used by us at selection of protectors, food additives.

Our works earlier had been established, that application of a method of bioindication in pharmacological, etc. researches, provides the way to study pharmacological preparations, adaptogens, antioxidants, biological active substances, including honey.

Researches of the above-stated objects it is made on cytotoxicity, on their biological activity, under following tests: Density of growth of a monolayer – CP, Estimate mitosis – MA %, Cell fission, the general fiber

We carry out a set of research on honey of Altai where a problem was definitions of quality of honey,

Its active influence on cellular culture and a possibility of application (or a choice) such honey which possesses medical or active properties. Honey from five apiaries have been presented. They have been taken from various seats and the emphasis has been made not only that grows around of an apiary, but also what water source.

So, 1. Test of honey of the apiary (№1) located nearby to quickly current water (r. Katun)

2. The apiary (test №2) is located near to an artesian well

3. Apiaries (tests 3, 4, 5) settled down nearby with a stream, giving a quiet water table.

At research it has been received on item

1, 2: cells are viable, but grow at a level control to which honey was not added. Cell fission also at a level control, i.e. such honey has not worked actively on growth and cell fission, though honey organoleptic property is excellent – fragrant, plastic, etc. Tests from apiaries 3, 4, 5 have yielded surprising results: on 20 – 30 % are more than cells, than in the control.

Cell fission high, cells shining, large, with greater kernels, goes synthesis of fiber. Viability of cells increases till 9 day, such honey, on visible, maybe medical. Unfortunately, at that time we did not manage to carry out research of compositions of various grasses, substances in common made with honey.

At research of several tests of honey the result - activity of honey is received, its medical qualities depend not only from plants with which the pollen, forming honey, but also from quality of water gathers.

It is necessary, that the source of water represented a quiet water table, Most likely here plays also influence of space factors especially solar activity. In subsequent clinical researches and it has appeared, that such honey is medical.

The conclusion summing up told – a method of bioindication with use of cellular cultures with success can replace experience on laboratory animals for the below-mentioned reasons.

1. Cheapness and availability
2. Fast reception of results and a possibility of lifetime supervision over model in current of all experiment.
3. High correlation of results IN VITRO and IN VIVO
4. The received lines keep high specific, органную, and fabric specificity.

This method can be used in ecology, фармокологии, and toxicology.

О ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АВТОКЛАВИРОВАННЫХ ЭКСТРАКТОВ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА (ЭПЧ) И СВИНЬИ (ЭПС) В КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

[1]Нардид О.А., [1]Щетинский М.И., [1]Розанова Е.Д., [1]Розанова С.Л., [2]Щетинская И.И.

[1]Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина
e-mail: schetin@list.ru
[2]Харьковский политехнический институт «НТУ – ХПИ», Харьков, Украина.

В настоящее время показана высокая клиническая эффективность ЭПЧ при коррекции урогенитальных осложнений у женщин, при лечении диабета, бесплодия, атеросклероза, паралича, ран и ожогов. Для снижения риска контаминации, предотвращения анафилактических осложнений, а также увеличения срока хранения препаратов в клинической практике широко применяются различные виды стерилизации. В наших исследованиях мы использовали щадящий режим автоклавирования экстрактов (15-20 мин при 120^0С). Свежевыделенные и автоклавированные экстракты разделяли методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-200. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по Бэнфорду и Харрису [1], а нуклеотидов – методом Спирина[2]. Антиоксидантную активность характеризовали по способности восстанавливать трехвалентное железо (метод FRAP), хелатировать ионы металлов переменной валентности и удалять свободные радикалы. Биологическую активность по отношению к эритроцитам оценивали по влиянию экспозиции с экстрактами на спонтанный гемолиз, осмотическую и кислотную устойчивость клеток.

Результаты исследований показали, что железо-восстанавливающая способность исходных ЭПЧ, колеблется в пределах, соответствующих активности 0,57-1,2 мМ аскорбата. После автоклавирования практически вся она сосредоточена во фракциях с молекулярной массой менее 5 кДа и уменьшается на 40 – 50%, в тоже время хелатирующая способность ЭПЧ сохраняется после автоклавирования примерно на 50%. Исследования способности экстрактов восстанавливать ABTS катионный радикал показали, что свежевыделенные ЭПЧ обладают антирадикальной активностью соответствующей активности 0,6-1,7 мМ ТРОЛОКСа. Автоклавирование снижает эту активность на 50 – 60%. В тоже время после автоклавирования сохраняется способность ЭПЧ снижать уровень спонтанного гемолиза и повышать осмотическую устойчивость эритроцитов и теряется их способность повышать кислотную устойчивость клеток. Хотя предложенный режим автоклавирования и позволил избавиться от высокомолекулярных белков и нуклеиновых кислот и сохранить антиоксидантную и биологическую активность при общей стерилизации, факт снижения рождаемости побудил нас обратить внимание на экстракты плаценты свиньи. С этой целью мы провели фракционную разгонку автоклавированного ЭПС. Следует отметить, что тенденция фракционного распределения с сохранением низкомолекулярной фракции аналогична, как для ЭПЧ, так и для ЭПС. Причем максимум белка приходился на фракцию менее 5 кДа. Анализ первых производных спектров поглощения этой фракции показал симбатность этих изменений, что указывает на общность состава этих фракций, как для ЭПЧ, так и для ЭПС. Аналогичное заключение можно сделать и по нуклеотидам. Расчет концентраций белка в ЭПЧ составил 7,6 ± 0,6 мг/мл и в ЭПС – 6,7 ± 0,6 мг/мл, и соответственно нуклеотидов 2580 ± 200 мкг/мл. Таким образом, можно ожидать, что вместе с сохранением низкомолекулярной фракции ЭПС, сохранится и основная часть антиоксидантной активности и частично биологическая активность по отношению к эритроцитам, а отсюда и перспективность их дальнейшего использования в клинической практике.

Литература :

1. *Harris D. A.* Spectrophotometric assays in: Spectrophotometry & spectrofluorimetry / D. A. Harris – Washington : IRL Press, 1987. – P. 49–90.
2. Молекулярная биология / Под ред. А. С. Спирина. – М. : Высшая шк., 1990. – 326 с.

ABOUT USING POSSIBILITY OF THE AUTOCLAVED HUMAN PLACENTAL EXTRACTS (HPE) AND PIG PLACENTAL EXTRACTS (PPE) IN CLINICAL PRACTICE

[1]Nardid O.A., [1]Schetinsky M.I., [1]Rozanova E.D., [1]Rozanova S.L., [2]Schetinskay I.I.

[1]Institute for problem of cryobiology and cryomedicine NAS of Ukraine, Kharkov, Ukraine
e-mail: schetin@list.ru
The Kharkov polytechnic institute «NTU –KhPI», Kharkov, Ukraine.

Nowadays the high clinical effect hpe was shown under correction of women urogenitals complications, medical treatment of diabetes, infertility, atherosclerosis, paralysis, wounds and scalds. The different types of sterilization are wide using in the clinical practice for reduction of the risk contamination, prevention of anaphylactic complication and for the rise of the term storage preparations. We used the sparing type of autoclaving hpe (15-20 min under 120^0C). Fresh-isolated and autoclaved hpe and ppe were separate the gel chromatography method on the column with sephadex G-200. Proteins and nucleotides concentration were determined by Banford and Harris and Spirin's methods accordingly. Antioxidant activity were described for the ability to set up Fe^{3+} (FRAP method), to chelate of the metals ions with the variable valence and to remove of free radicals. Biological activity to the erythrocytes were estimated by the influence of exposition with extracts on the spontaneous hemolysis, osmotic and acid stability of cells.

The results of investigations shown that Fe – reduced ability of fresh hpe were fluctuated within 0,57-1,2 mM of ascorbate. After autoclaving it was practically concentrated in fractions with molecular mass the less 5 kDa and were decreased on 40 – 50 %, in that time the chelating ability hpe were remained 50% after autoclaving. Investigation of the extract ability to reduce $ABTS^+$ cation radical shown that fresh hpe had the antiradical activity within 0,6 – 1,7 mM activity of TROLOX. The autoclave process decreased this activity on 50 – 60%. In that time, after autoclaving were preserved ability hpe to reduce the level of spontaneous hemolysis and to raise of osmotic stability of erythrocytes and to disappear the ability to raise of acid stability of cells. Although, the our conditions of autoclaving allowed to get out of high molecular proteins, nucleon acids and preserve antioxidant and biological activity under the common sterilization, the fact of lowering birth rate forced to pay attention to ppe. With this purpose we carry out the fraction division autoclaved ppe. It should be noted that the tendency of fraction distribution with the preservation of low molecular fraction was analogous both for ppe and for hpe. Moreover, maximum of proteins was on the fraction less 5 kDa. The analysis first derivations of the absorbance spectra these fractions shown on the analogous changes, that are indicating to the commonality composition both for ppe and for hpe. The analogous conclusion we can do for the nucleotides.

The calculation of the protein concentration was in hpe 7,6 ± 0,6 mg/ml and in ppe was 6,7 ± 0,6 mg/ml and for the nucleotides 2580 ± 200 µg/ml and 1860 ± 200 µg/ml accordingly. Thus, we can expect, that with the preservation of low molecular fractions of ppe, can be preserved the main part of antioxidant activity and partly biological activity to the erythrocytes and hence the perspective of further using in clinical practice.

References:

1.*Harris D. A.* Spectrophotometric assays in: Spectrophotometry & spectrofluorimetry / D. A. Harris – Washington : IRL Press, 1987. – P. 49–90.
2.Molecular biology/ By red. A.S. Spirin.-:High sch., 1990.-326p.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ГЕПАТОПРОТЕКТОРОВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТЕАТОГЕПАТИТА У КРЫС

Нарута Е.Е., Николаева И.А., Кирко С.Н., Буко В.У.

Отдел биохимической фармакологии, Институт фармакологии и биохимии Национальной Академии Наук Беларуси, Гродно, Беларусь
e-mail: naruta@list.ru

Обоснование: Урсодеоксихолевая кислота (УДХК) представляет собой желчную кислоту природного происхождения с выраженными гепатопротективными свойствами. Использование УДХК при неалкогольных стеатогепатитах (НАСГ) описано в ряде публикаций (1). Недавно нами было показано, что УДХК дозозависимым образом вызывает биохимические и морфологические изменения у крыс с НАСГ, вызванным кормлением метионин-холин дефицитной диетой (2). В данном исследовании мы оценили эффективность УДХК и ее комбинаций с предполагаемыми гепатопротекторами в условиях экспериментального НАСГ.

Методы: В данном опыте нами использованы самцы Вистар (180-200 г). Животные содержались на МХДД в течение 10 недель. Крысы опытных групп получали ежедневно УДХК в комбинации с тиоктовой кислотой (ТК), глицином (Гли), симвастатином (Сим), аминосалициловой кислотой (АсК) или пентоксифиллином (ПФ) в течение последних двух недель опыта. Степень повреждения печени оценивалась морфологическими и биохимическими методами.

Таблица 1. Схема эксперимента и дозы препаратов.

о	**Группы**	**мг/кг сутки**
1	УДХК (все группы)	30
2	УДХК + тиоктовая кислота (**ТК**)	10
3	УДХК + глицин (**Гли**)	30
4	УДХК + симвастатин (**Сим**)	10
5	УДХК + аминосалициловая кислота (**АсК**)	100
6	УДХК + пентоксифиллин (**ПФ**)	20

Результаты: УДХК в виде монопрепарата или в сочетании с ТК или АсК уменьшала площадь аккумуляции липидов, которая оценивалась морфометрически путем окраски срезов Суданом черным. Уровень триглицеридов печени достоверно снижался у крыс, получавших УДХК, а также комбинацию ее с ТК или ПФ. Все субстанции нормализовали активности сывороточных маркерных ферментов – Аст, АлТ и щелочной фосфатазы, хотя Сим и АсК не изменяли активность щелочной фосфатазы. Концентрация глюкозы крови значительно возрастала у МХДД-кормленных крыс, тогда как сывороточный инсулин у этих животных был снижен. УДХК и ее сочетания с ТК, Гли и ПФ уменьшал уровень глюкозы. Эти же соединения, кроме УДХК+ПФ, нормализовали уровень инсулина в сыворотке.

УДХК и все ее комбинации, за исключением ПФ, уменьшали интенсивность НАДФН-индуцированной хемилюминесценции, усиленной люцигенином, тогда как концентрация TBARS в печени снижалась в группе, получавшей ТК, и возрастала после приема Сим, АсК или ПФ.

Заключение: Полученные данные позволяют предположить, что среди протестированных комбинаций ТК+УДХК была наиболее эффективной в качестве гепатопротектора. Однако, требуются дальнейшие исследования ее эффективности.

Литература:

1. *Thomas C., Pellicciani R., Pruzanski M., Auwerx J., Schoojans K* Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. Nat. Rev. Drug. Discov., 2008, 7(8), p. 678-693.
2. *Buko V.U., Naruta E.E.., Nikolayeva I.A., Lis R.E., Kirko S.N.* //The dose-dependent beneficial effect of ursodeoxycholic acid in rats with non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine and choline deficient diet - Здоровье и питание, Минск. 2005, с. 46-52.

THE USE OF PROMISING HEPATOPROTECTORS FOR CORRECTION OF EXPERIMENTAL STEATOHEPATITIS IN RATS

Naruta E.E., Nikolayeva I.A., Kirko S.N., Buko V.U.

Department of Biochemical Pharmacology, Institute of Pharmacology and Biochemistry of National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus
e-mail: naruta@list.ru

Background: Ursodeoxycholic acid (UDCA) is a naturally occurring bile acid with distinct hepatoprotective activities. Using of UDCA in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) was described in many publication (1). Recently we have found that UDCA dose-dependently causes a reversal of biochemical and morphological changes in rats with NASH induced by methionone and choline-deficient diet (MCDD) feeding (2). In this study we evaluated the effects of UDCA and its combination with proven and promising hepatoprotectors in an experimental NASH model.

Methods: In present study we used male Wistar rats (180 - 200 g) which were fed MCDD during 10 weeks. All rats from experimental groups were daily administered with UDCA in combination with tioctic acid (TA), glycine (Gly), simvastatin (Sim), aminosalicylic acid (AsA), pentoxyphilline (Ptx) during the last two weeks on the experiment. The severity of liver damage was evaluated morphologically and by biochemical methods.

Table 1. The scheme of experiment and doses of assay substances.

No	Treatments	mg/kg b.w./ day
1	UDCA (for all groups)	30
2	UDCA + tioctic acid (**TA**)	10
3	UDCA + glycine (**Gly**)	30
4	UDCA + simvastatin (**Sim**)	10
5	UDCA + aminosalicylic acid (**AsA**)	100
6	UDCA + pentoxiphilline (**Ptx**)	20

Results: UDCA alone or in combination with TA or AsA decreased the square of lipid accumulation on slides stained with Sudan black and evaluated by morphometry. The liver triglyceride content was significantly decreased in rats treated with UDCA and its combination with TA and Ptx. All the agents applied normalized serum AsAT, AlAT and alkaline phosphatase activities, but Sim, AsA and Toc did not affect alkaline phosphatase activity. The blood glucose concentration was significantly increased in MCDD-fed rats, whereas serum insulin was dramatically decreased in these rats. The UDCA and its combination with TA, Gly, and Ptx lowered blood glucose. These compounds, except for UDCA+Ptx, normalised serum insulin content.

UDCA and all the combinations, with the exception of UDCA+Ptx, decreased the intensity of NADPH-induced chemiluminescence enhanced by lucigenin, whereas liver TBARS concentration decreased after treatment with TA and increased in rats treated with Sim, AsA and Ptx.

Conclusion: The data obtained suggest that among the tested combinations, TA together with UDCA was more effective as hepatoprotector. However, further search for most effective combinations is required.

References:

1. *Thomas C., Pellicciani R., Pruzanski M., Auwerx J., Schoojans K* Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. Nat. Rev. Drug. Discov., 2008, 7(8), p. 678-693.
2. *Buko V.U., Naruta E.E.., Nikolayeva I.A., Lis R.E., Kirko S.N.* //The dose-dependent beneficial effect of ursodeoxycholic acid in rats with non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine and choline deficient diet - Здоровье и питание, Минск. 2005, с. 46-52.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОРРЕКЦИИ БИОПОЛИМЕРОМ ИЗ ТКАНЕЙ РАПАНЫ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО БАЛАНСА В ГЕПАТОЦИТАХ МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПРИ НЕСБАЛАНСИРОВАННОМ ПИТАНИИ

[1]Никитченко Ю.В., [1]Дзюба В.Н., [2]Битютская О.Е., [1]Бондарь В.В., [1]Попович А.С., [1]Шеремет А.А.

[1]НИИ биологии Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина, Харьков, Украина. e-mail: yunikitchenko@mail.ru
[2]Южный НИИ морского рыбного хозяйства и океанографии, Керчь, Украина

Проведенные ранее нами исследования свидетельствуют, что несбалансированная по содержанию животных белков и витаминов антиоксидантного ряда диета приводит к увеличению содержания гидроперекисей липидов (ГПЛ) и шиффовых оснований (ШО) в печени и крови молодых и старых крыс, которое обусловлено активацией генерации активных форм кислорода и снижением активности ряда антиоксидантных ферментов. Такое нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса в тканях подопытных животных может быть основной причиной преждевременного старения, в связи с чем и требует антиоксидантной коррекции.

Целью настоящей работы было исследование эффективности антиоксидантного и мембранопротекторного действия пищевой добавки «Биополимер из тканей рапаны» (БР; декларац. пат. 60504 UA, A 7 A61K35/36) на изолированных гепатоцитах 5- и 20-месячных крыс, содержавшихся на стандартной и несбалансированной диетах.

Проведенные нами исследования антиокислительной и антирадикальной активности БР в условиях in vitro показали, что пищевая добавка БР обладает определенной способностью ингибировать накопление МДА в суспензии желточных липопротеидов и выраженной способностью перехватывать $^{\cdot}OH$-радикалы.

Показано, что содержание в течение 60 дней молодых и старых крыс на несбалансированной диете приводило к увеличению выхода из изолированных гепатоцитов лактатдегидрогеназы, $^{\cdot}OH$- и $O_2^{\cdot-}$-радикалов и накоплению в клетках ГПЛ и ШО (табл.). При этом из всех исследованных антиоксидантных ферментов значительно снижалась (на 40 – 48%) только активность селензависимой глутатионпероксидазы (ГП). Все исследованные показатели в гепатоцитах молодых и старых животных в ответ на несбалансированную диету изменялись практически в одинаковой степени.

Прооксидантный потенциал гепатоцитов 5- и 20-месячных крыс, содержавшихся на стандартной, несбалансированной и несбалансированной, дополненной биополимером из тканей рапаны, диетах

Возраст, мес.	Вид диеты		
	стандартная	несбалансированная	несбалансированная + БР
Накопление гидроперекисей липидов, нмоль МДА/10^6 клеток за 30 мин инкубации			
5	0,30 ± 0,03	0,39 ± 0,02*	0,28 ± 0,03
20	0,32 ± 0,02	0,38 ± 0,01*	0,30 ± 0,03
Накопление шиффовых оснований, усл. ед./10^6 клеток за 10 мин инкубации			
5	30,1 ± 2,6	40,2 ± 3,5*	29,6 ± 2,9
20	32,6 ± 2,6	42,8 ± 3,7*	28,9 ± 3,4
Интенсивность генерации $O_2^{\cdot-}$-радикалов, пмоль формазана/мин·10^6 клеток			
5	192,2 ± 12,8	237,4 ± 18,8	165,0 ± 33,7
20	198,3 ± 10,7	269,8 ± 26,8*	212,8 ± 28,8
Интенсивность генерации $^{\cdot}OH$-радикалов, ед. опт. плотн./мин·10^6 клеток			
5	0,0114 ± 0,0019	0,0178 ± 0,0021*	0,0128 ± 0,0028
20	0,0123 ± 0,0014	0,0173 ± 0,0017*	0,0132 ± 0,0025

Примечание. * – $P < 0,05$ по сравнению с показателем при стандартной диете.

Добавление в несбалансированный рацион БР приводило к нормализации выхода из гепатоцитов молодых и старых крыс лактатдегидрогеназы, $^{\cdot}OH$- и $O_2^{\cdot-}$-радикалов и концентрации ГПЛ и ШО. При этом селензависимаяГП активность в клетках подопытных 5- и 20-месячных крыс оставалась существенно сниженной по сравнению с уровнем активности у животных, получавших стандартный рацион питания.

В целом, полученные данные свидетельствуют о способности пищевой добавки БР нормализовать прооксидантный потенциал гепатоцитов молодых и старых животных, получавших несбалансированный рацион питания. Вместе с тем, отсутствие коррегирующего действия БР на активность основного антиоксидантного фермента, утилизирующего активные формы кислорода, азота и липидов, может быть критичным в функционировании прооксидантно-антиоксидантной системы и поэтому требует дополнения этой пищевой добавки биологически активными веществами, способными увеличивать активность эндогенных антиоксидантных ферментов и, особенно, селензависимой глутатионпероксидазы.

EFFICIENCY OF CORRECTION BY BIOPOLYMER FROM RAPANA TISSUES THE PROOXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE IN HEPATOCYTES OF YOUNG AND OLD RATS UNDER UNBALANCED NUTRITION

[1]Nikitchenko Yu.V., [1]Dzyuba V.N., [2]Bituytskaya O.Ye., [1]Bondar V.V., [1]Popovich A.S., [1]Sheremet A.A.

[1]Scientific-research Institute of Biology of V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov, Ukraine.
e-mail: yunikitchenko@mail.ru
[2]South Scientific-research Institute of Marine Fish Industry and Oceanography, Kerch, Ukraine

Carried earlier our investigations testify to the fact that unbalanced by the content of animal proteins and vitamins-antioxidants diet leads to the increase of lipid hydroperoxides (LHP) and Schiff bases (SB) content in liver and blood of young and old rats. This increase is conditioned by the activation of reactive oxygen species generation and decline in activity of some antioxidant enzymes. Such disturbance of prooxidant-antioxidant balance in tissues of experimental animals may be the main reason of premature aging and in this connection it calls for antioxidant correction.

The purpose of the study was investigation of efficiency of antioxidant and membrane protective effect of food addition “Biopolymer from rapana tissues” (BR; declarat. patent 60504 UA, A 7 A61K35/36). The study was carried out on hepatocytes of 5- and 20-month-old rats kept at standard and unbalanced diets.

The fulfilled investigations of antioxidant and antiradical activities of BR in vitro have given the evidence that food addition BR possessed certain ability for inhibition of malondialdehyde accumulation in yolk lipoproteids suspension and marked ability for scavenging of $^{\cdot}OH$-radicals.

The maintenance of young and old rats at unbalanced diet during 60 days was shown to lead to the increase of lactate dehydrogenase, $^{\cdot}OH$- and O_2^{-}-radicals release from isolated hepatocytes and to LHP and SB accumulation in the cells. At the same time from all investigated antioxidant enzymes only the activity of selenium-dependent glutathione peroxidase (GP) was essentially (by 40 – 48%) decreased. In response to unbalanced diet all investigated indices in hepatocytes of young and old rats were changed practically to the same degree.

Prooxidant potential of hepatocytes of 5- and 20-month-old rats kept at standard, unbalanced and unbalanced, supplemented with biopolymer from rapana tissues, diets

Age, month	Kind of diet		
	standard	unbalanced	unbalanced + BR
Lipid hydroperoxides accumulation, nmol MDA/10^6 cells for 30 min of incubation			
5	0,30 ± 0,03	0,39 ± 0,02*	0,28 ± 0,03
20	0,32 ± 0,02	0,38 ± 0,01*	0,30 ± 0,03
Schiff bases accumulation, relat. units/ 10^6 cells for 10 min of incubation			
5	30,1 ± 2,6	40,2 ± 3,5*	29,6 ± 2,9
20	32,6 ± 2,6	42,8 ± 3,7*	28,9 ± 3,4
Intensity of O_2^{-}-radicals generation, pmol formazan/min·10^6 cells			
5	192,2 ± 12,8	237,4 ± 18,8	165,0 ± 33,7
20	198,3 ± 10,7	269,8 ± 26,8*	212,8 ± 28,8
Intensity of $^{\cdot}OH$-radicals generation, units of optical density/min·10^6 cells			
5	0,0114 ± 0,0019	0,0178 ± 0,0021*	0,0128 ± 0,0028
20	0,0123 ± 0,0014	0,0173 ± 0,0017*	0,0132 ± 0,0025

* – P < 0,05 versus standard diet.

Supplementation of unbalanced ration by BR led to the normalization of lactate dehydrogenase, $^{\cdot}OH$- and O_2^{-}-radicals release and concentration of LHP and SB in hepatocytes of young and old rats. At the same time selenium-dependent GP activity in the cells of 5- and 20-month-old experimental rats remained essentially decreased as compared with the level of activity in animals kept at the standard food allowance.

As a whole the obtained data are the evidence of the ability of food addition BR to normalize prooxidant potential in hepatocytes of young and old animals kept at the unbalanced ration. At the same time the lack of BR correction effect on the activity of the main antioxidant enzyme utilizing the active oxygen, nitrogen and lipid species may be the crucial moment in prooxidant-antioxidant system functioning and therefore demands supplementation of this food addition by biologically active sunstances capable to increase the activity of endogenous antioxidant enzymes and especially the activity of selenium-dependent glutathione peroxidase.

ПРИМЕНЕНИЕ КРИСТАЛЛОВ АРСЕНИДА ГАЛЛИЯ ДЛЯ АКТИВАЦИИ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ СУСТАВНОГО ХРЯЩА

[1]Никитюк И.Е., [2]Петраш В.В., [2]Ильина Л.В., [3]Кубасов В.А.

[1]Научно-исследовательский детский ортопедический институт им. Г.И.Турнера Росздрава, Санкт-Петербург, Россия. e-mail: turner01@mail.ru
[2]Научно-исследовательский институт промышленной и морской медицины Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия. e-mail: spbism@mail.ru
[3]Научно-исследовательский институт электрофизической аппаратуры им. Д.В.Ефремова Росатома, Санкт-Петербург, Россия

В связи с острой необходимостью разработки эффективных методов полного восстановления хрящевых структур в области их дефекта, особое клиническое значение приобретает проблема активации процессов регенерации пораженного суставного хряща. Применение полупроводниковых материалов для индуцирования регенерации эластичного хряща продемонстрировано в ряде экспериментальных работ [1,2]. Представляется перспективным использовать для этих целей полупроводниковые кристаллические структуры, например, арсенида галлия, который является материалом, способным благотворно влиять на биологические ткани.

Целью проведенного исследования являлось изучение in vitro влияния монокристаллов арсенида галлия (GaAs) на репаративную способность суставного хряща в условиях исключения воздействия на них клеточно-гуморальных факторов со стороны организма.

Материал и методы. У 3-х месячных кроликов породы Шиншилла (n=8) под местной анестезией в соответствии с Международными требованиями по гуманному отношению к экспериментальным животным иссекали и изолировали от среды полиэтиленовой пленкой эксплантаты проксимальных фаланг задних конечностей, содержащие суставной хрящ, которые термостатировали в течение 2 суток при 37°С на монокристаллах арсенида галлия размерами 10×10×0,5 мм. В контрольной группе GaAs отсутствовал. Процессы, происходящие в хрящевой ткани, изучали каждые сутки классическим гистологическим методом, серийные срезы окрашивали гематоксилином – эозином и альциановым синим. Дополнительно использовали реактив Шиффа для проведения реакции Фёльгена, которая является специфической пробой на ДНК и очень удобна для изучения клеточных ядер.

Результаты. В контрольной группе эксплантатов в суставном хряще с первого дня термостатирования наблюдались явления прогрессирующего некроза, начинающиеся с поверхностных отделов. К концу вторых суток некротические процессы охватывали весь хрящ и носили характер тотального лизиса, что проявлялось в разрушении ядерного вещества и прекращении восприятия красителя хондроцитами. По сравнению с контрольными образцами, строение суставного хряща опытной группы было с незначительными дистрофическими изменениями, несмотря на полное отсутствие трофики. Нахождение хряща вблизи с кристаллами арсенида галлия привело к характерным регенераторным изменениям в его структуре. Морфологически это проявлялось в появлении большого числа хондроцитов, имеющих от 1 до 3 дочерних ядер. В базальной зоне хряща выявлялись изогенные клеточные группы, которые в норме в ней не наблюдаются.

Природа этого явления пока остается полностью не выясненной. Предпосылками для объяснения указанных фактов могут послужить известные из научной литературы сведения о том, что клетки хрящевой ткани (хондроциты) генерируют электрические потенциалы, а кристаллический GaAs, способен, с учетом физики внутреннего кристаллического поля, преобразовывать электромагнитные сигналы. Взаимодействие хондроцитов с внешней кристаллической структурой, приводящее к активизации метаболических процессов в хряще, возможно, найдет свое объяснение при его рассмотрении как следствия возникновения резонансов клеточных осцилляций с флуктуациями кристаллического поля GaAs [3, 4].

Таким образом, проведенное исследование показало, что эксплантаты суставного хряща при инкубации вне организма могут не только сохранять жизнеспособность, но и видоизменять свою структуру находясь вблизи с кристаллическим арсенидом галлия. Дальнейшее изучение выявленных закономерностей и их биофизических механизмов может быть перспективным в плане использования имплантатов из арсенида галлия, активирующих регенерацию суставного хряща при различных видах его повреждения.

Литература:

1. *И.Е.Никитюк, К.А.Афоничев, В.В.Петраш, Л.В.Ильина* // Индуцирование регенерации эластичного хряща кристаллическими аппликаторами из полупроводниковых материалов как потенциальный метод лечения глубоких ожогов ушной раковины (экспериментальное исследование) - Травматология и ортопедия России, 2008, № 1(47), с.45-48.
2. *И.Е.Никитюк, И.В.Попов, В.В.Петраш* // Активация регенерации хряща при дистанционном взаимодействии с кристаллическими структурами - Травматология и ортопедия России, 2008, № 4(50), с. 95-96.
3. *Дж. Ван-Флек* // Квантовая механика – ключ к пониманию магнетизма: нобелевская лекция по физике 1977 года - Успехи физических наук, 1979, т.127, вып. 1, с. 3-18.
4. M. *Synder, H.T.Harcke, K.Conard et al.* // Experimental epiphysiodesis: magnetic resonance imaging evaluation with histopathologic correlation - Internat. Orthop. (SICOT), 2001, v 25, № 6, p. 337-342.

APPLICATION OF GALLIUM ARSENIDE CRYSTALS FOR ACTIVATION OF CELL PROLIFERATION ARTICULAR CARTILAGE

[1]Nikityuk I.E., [2]Petrash V.V., [2]Ilyina L.V., [3]Kubasov V.A.

[1]Nauchno Children's Orthopedic Research Institute named G.I.Turner Medical, St. Petersburg, Russia.
e-mail: turner01@mail.ru
[2]Nauchno Research Institute of Industrial and Marine Medicine, Federal Medical-Biological Agency, St. Petersburg, Russia.
e-mail: spbism@mail.ru
3Nauchno Research Institute Electrophysical Apparatus named D.V Efremov Rosatom, St. Petersburg, Russia

Due to the urgent need to develop effective methods for complete recovery of cartilaginous structures in the area of the defect, especially the clinical significance is the problem of the activation process of regeneration of the affected articular cartilage. Application of semiconductor materials to induce regeneration of elastic cartilage demonstrated in a number of experimental studies [1,2]. It seems promising to use for these purposes semiconductor crystal structures, such as gallium arsenide, which is a material that can beneficially affect the biological tissue.

The aim of the study was to investigate the in vitro effect of single crystals of gallium arsenide (GaAs) on reparative ability of articular cartilage in exceptional exposure to cell-humoral factors from the body.

Materials and methods. At 3-month old Chinchilla rabbits (n = 8) under local anesthesia in accordance with international standards for humane attitude to the experimental animals were dissected and isolated from the environment with plastic wrap explants of the proximal phalanx hind limb containing the articular cartilage, which was thermostated within 2 days at 37 ° C on single crystals of gallium arsenide dimensions of 10 × 10 × 0,5 mm. In the control group GaAs absent. Processes occurring in the cartilage tissue, and studied every day classic histological method, serial sections were stained with hematoxylin - eosin and alcian blue. Additionally, using the Schiff reagent for the reaction Fëlgena, which is a specific breakdown of DNA and is very convenient for the study of cell nuclei.

Results. In the control group in the articular cartilage explants from day incubation phenomena of progressive necrosis, beginning with the departments of the surface. By the end of the second day of necrotic processes cover the whole cartilage and had the character of the total lysis, which was manifested in the destruction of nuclear substances and the cessation of perception dye chondrocytes. Compared with control samples, the structure of the articular cartilage of experimental group was, with minor degenerative changes, despite the complete absence of trophic. The finding of cartilage near the crystals of gallium arsenide resulting in a characteristic regenerative changes in its structure. Morphologically this is manifested in the appearance of large numbers of chondrocytes with 1 to 3 of daughter nuclei. In the basal zone of the cartilage revealed isogenic cell groups that normally it does not occur.

The nature of this phenomenon is still not fully understood. Prerequisites for an explanation of these facts may serve as a well-known information from the scientific literature that cartilage cells (chondrocytes) generate electric potentials and crystalline GaAs, capable of taking into account the physics of the internal crystal field, convert electromagnetic signals. Interaction of chondrocytes with an external crystal structure, leading to the activation of metabolic processes in the cartilage may find its explanation for its consideration as a consequence of the resonances of cellular oscillations to fluctuations in the crystal-field GaAs [3, 4].

Thus, this study showed that the articular cartilage explants by incubation outside the body can not only survive, but to modify its structure being close to the crystal of gallium arsenide. Further study revealed regularities and their biophysical mechanisms may be promising in the use of implants made of gallium arsenide, activating regeneration of articular cartilage in different types of damage.

References:

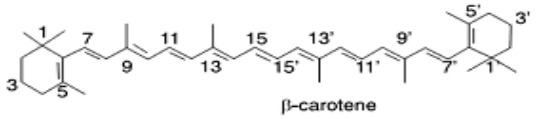
1.*I.E. Nikityuk, K.A. Afonichev, V.V. Petrash, L.V. Ilina.* // Induction of elastic cartilage regeneration crystal applicators of semiconductor materials as a potential treatment for deep burns ear (experimental study) - Traumatology and orthopedics in Russia, 2008, № 1 (47), pp.45-48.
2.*I.E. Nikityuk, I.V. Popov, V.V. Petrash.* // Activate the regeneration of cartilage in the remote interaction with the crystal structures - Traumatology and orthopedics in Russia, 2008, № 4 (50), pp. 95-96.
3.*J. Van Vleck* // Quantum mechanics - the key to understanding magnetism: the Nobel Lecture in Physics 1977 - Physics-Uspekhi, 1979, t.127, Vol. 1, p. 3-18.
4.*M. Synder, H.T.Harcke, K. Conard et al.* // Experimental epiphysiodesis: magnetic resonance imaging evaluation with histopathologic correlation - Internat. Orthop. (SICOT), 2001, v 25, № 6, p. 337-342.

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ДОБАВКИ К ПИЩЕ «ТОМАТОГЕНИН»

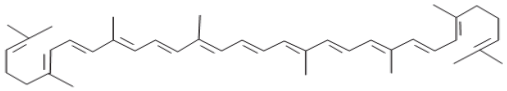
Николаевич Л.Н., Жукова И.А., Жебракова И.В., Морозова Е.В., Казючиц О.А., Марьянкова Р.Ф., Николаевич Е.С., Ильянок Г.А., Демид Д.И., Добыш И.И., Петров П.Т.

Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
e-mail: nikolarisa@tut.by

Одним из наиболее актуальных направлений современной фармакологии является поиск биологически активных веществ для разработки новых более эффективных фармацевтических средств на основе природных антиоксидантов, обладающих генопротекторным цитопротекторным, гиполипидемическим и противоопухолевым действием с целью профилактики заболеваний. В этой связи был выбран ликопин. Ликопин является ациклическим изомером ß-каротина. В отличие от β-каротина, ликопин ($\psi_1\psi$-каротин) представляет собой полиизопреновую цепь без шестиатомных циклических радикалов, не вызывает гипервитаминоза, хорошо абсорбируется, не обладает токсическим действием даже в диапазоне высоких доз. Поскольку ликопин не имеет ß-ионной кольцевой структуры, он не превращается в витамин А.



β-carotene


Lycopene

Генопротекторные, цитопротекторные и гиполипидемические свойства активного фармакологического вещества – ликопина нами были изучены ранее [1-3], а также разработана рецептура и лекарственная форма ликопинсодержащей биологически активной добавки к пище (БАД) «Томатогенин». Проведен микробиологический анализ продукта на антибактериальную, противогрибковую активность и чистоту. Изучена стабильность (определение количественного содержания ликопина) в условиях ускоренного хранения (+40±2 ^{0}C). Результаты микробиологического анализа показали, что БАД «Томатогенин» не обладает выраженной антимикробной активностью и микробиологическая чистота препарата соответствует требованиям, предъявляемым к БАД. Результаты, полученные при ускоренном хранении БАД «Томатогенин», позволяют сделать вывод о соответствии срока хранения годности 2-м годам, что соответствует ТУ BY 500043647.005-2010 (ИФБ НАН Беларуси). Противоопухолевые свойства БАД «Томатогенин» изучали на модели спонтанного и индуцированного канцерогенеза. В качестве канцерогена использовали уретан (этилкарбомат), вызывающий аденомы легких у мышей **линии ICR.** Латентный период возникновения опухолей легких у мышей под влиянием уретана короток (видимые опухолевые узлы обнаруживаются уже через 2 месяца в легких у мышей ISR. Уретан вводили мышам в дозе 1,5 мг/г массы в/б. Спустя 4 месяца после введения уретана и 5 месяцев после начала эксперимента со спонтанным канцерогенезом (без канцерогена) мышей декапитировали, выделяли легкие, которые фиксировали в 10% растворе формалина, опухолевые узлы в легких подсчитывали с помощью лупы. Определяли среднее количество аденом легких на мышь.

Показано, что ликопинсодержащая БАД «Томатогенин» оказывает эффективное противоопухолевое действие на организм мышей высокораковой линии ICR, подавляя индуцированное опухолеобразование. Наблюдается достоверное уменьшение количества опухолей в легких на мышь в условиях индуцированного канцерогенеза (в контроле (уретан в дозе 1,5 мг/г массы однократно в/б) - 23,3±0,8% и опыте (БАД «Томатогенин» в дозе 93 мг/кг в течение 14 дней в/ж +уретан в дозе 1,5 мг/г массы однократно в/б) – 14,8±0,2% соответственно, P<0,001). У интактных животных наблюдается очень низкий уровень частоты аденом на 1 мышь (0,22±0,15%).

Таким образом, ликопинсодержащая БАД «Томатогенин» характеризуется онкопротекторным действием и может быть рекомендована в качестве противоопухолевого средства в зонах с повышенной канцерогенной нагрузкой и в случае предполагаемого наследственного опухолеобразования.

Литература:

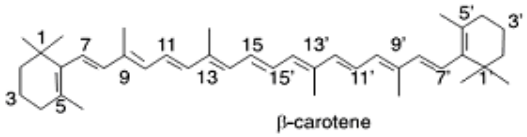
1. *Е.В Морозова., Л.Н. Николаевич.* Характеристика экспрессии генов PPAR, пролиферации, апоптоза и клеток с микроядрами у крыс с гиперлипидемией и введении ликопина // Белорусские лекарства: материалы Международной научно-практической конференции. – Минск, 2010, с. 140-143.
2. *Л.Н. Николаевич, В.П. Савицкий, Е.В. Морозова, В.М. Насек, И.А. Жукова, И.В. Жебракова, А.С. Нехай.* Влияние ликопина на плоидность клеток крови и оценка его токсичности. // Белорусские лекарства: материалы Международной научно-практической конференции.– Минск, 2010, с. 160-161
3. *Е.В. Морозова, Л.Н. Николаевич.* Значение ликопина в экспрессии генов PPAR в белой висцеральной жировой ткани крыс при экспериментальной гиперлипидемии. // Новости медико-биологических наук. – 2010, т.1, № 2, с. 202-207.

ANTITUMOR EFFECT OF BIOACTIVE FOOD ADDITIVE "TOMATOGENIN"

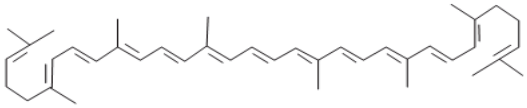
Nikolaevich L.N., Zhukova I.A., Zhebrakova I.V., Morozova E.V., Kazyuchits O.A., Mar'yankova R.F., Nikolaevich E.S., Il'yanok G.A., Demid D.I., Dobysh I.I., Petrov P.T.

Institute of Pharmacology and Biochemistry of NASB, Minsk, Belarus
e-mail: nikolarisa@tut.by

The search for new bioactive substances in order to develop new efficient pharmacological agents on the basis of natural antioxidants with genoprotective, cytoprotective, hypolipidemic and antitumor properties for preventive health care is one of topical trends of modern pharmacology. In this connection, we have chosen lycopene. The lycopene is an acyclic isomer of β-carotene. Unlike the β-carotene, the lycopene ($\psi_1\psi$-carotene) is a polyisoprene chain without hexatomic cyclic radicals, it does not cause hypervitaminosis, it is absorbed easily, does not exert toxicity even in high dosage. The lycopene has not β-ionic ring structure, therefore it does not turn into vitamin A.



β-carotene



Lycopene

Previously, we have studied the genoprotective, cytoprotective and hypolipidemic properties of lycopene as bioactive substance [1-3], and we have developed the drug formulation of lycopene-containing bioactive food additive "Tomatogenin". We have carried out the microbiological analysis of this product concerning its antibacterial and antifungal activity, and its purity. The stability (determinig the quantitative content of lycopene) has been studied in the conditions of abbreviated storage (+40 ± 2°C). By the results of microbiological analysis, "Tomatogenin" does not possess the antibacterial activity, and its microbiological purity meets the requirements for food additives. The results of abbreviated storage allow to conclude that the shelf life of "Tomatogenin" is 2 years meeting thus the requirements of Technical Conditions "BY 500043647.005-2010" (IPB NASB). We have studied the antitumor properties of "Tomatogenin" in the models of spontaneous and induced carcinogenesis. Urethane (ethyl carbamate) that causes pulmonary adenoma in ICR mice has been used as carcinogen. The latent period of pulmonary tumor onset in mice under the influence of urethane is short (the visible tumor nodules are observed already after two months in ICR mice). We have administered urethane to mice in 1.5 mg/g dose intraperitoneally. 4 months after the urethane administration and 5 months after the beginning of experiment with spontaneous carcinogenesis (without the carcinogen), the mice have been decapitated; their lungs isolated and preserved in 10% formalin solution; the tumor nodules calculated using lens. The average number of pulmonary adenomas per mouse has been determined.

We have shown that the lycopene-containing food additive "Tomatogenin" exerts antitumor effect on the organism of ICR mouse through the inhibition of induced neoplasm. In the conditions of induced carcinogenesis, the verifiable decrease of number of pulmonary tumors per mouse has been observed (in the control (1.5 mg/g urethane one time intraperitoneally) – 23.3 ± 0.8%; in the experiment (93 mg/kg "Tomatogenin" daily during 14 days intragastrically + 1.5 mg/g urethane one time intraperitoneally) – 14.8 ± 0.2%, $P<0.001$). In the intact animals, very low level of adenomas frequency per mouse is observed (0.22 ± 0.15%).

Thus the lycopene-containing food additive "Tomatogenin" possesses the oncoprotective properties and can be recommended as prophylactic antitumor agent.

References:

1. *E.V. Morozova, L.N. Nikolaevich* Characteristic Of Level Of PPAR Genes Expression, Apoptosis And Micronucleated Cells In Hyperlipidemic Rats Under Lycopene Administration//"Belarus Drugs": Proceedings of the International Science-Practical Conference – Minsk, 2010, p.140-143 (In Russian)
2. *L.N. Nikolaevich, V.P. Savitskij, E.V. Morozova, V.M. Nasek, I.A. Zhukova, I.V. Zhebrakova, A.S. Nekhaj* Effect Of Lycopene On Blood Cell Ploidy And Estimation Of Toxicity// "Belarus Drugs": Proceedings of the International Science-Practical Conference – Minsk, 2010, p.160-161 (In Russian)
3. *E.V. Morozova, L.N. Nikolaevich* Effect of lycopene on genes *PPAR* expression in white visceral fatty tissue in rats experimental hyperlipidemia // News of biomedical sciences - Minsk, 2010, Vol. 1, N 2, p.202-207.

ВПЛИВ VEGF ТА EGF, А ТАКОЖ ЇХ АНТАГОНІСТІВ НА ПРОЛІФЕРАТИВНУ АКТИВНІСТЬ ТА РІВЕНЬ СПОЖИВАННЯ ГЛЮКОЗИ ЕНДОТЕЛІАЛЬНИМИ КЛІТИНАМИ

Ніколаєнко Т.В., Галковська Г.В., Непийвода Х.Д., Лаврова К.В., Гарманчук Л.В.

ННЦ „Інститут біології" КНУ імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail: liudmylagarmanchuk@rambler.ru

Вступ. Одним з перспективних напрямків протипухлинної терапії в останні десятиріччя є пригнічення пухлинного ангіогенезу, переваги якого полягають у низькій цитотоксичності по відношенню до нормальних тканин організму, а також у відсутності формування лікарської резистентності, оскільки основною мішенню ангіогенезу виступають ендотеліальні клітини. Ангіогенез – складний багатоступеневий процес, кінцевим етапом якого є формування васкулярної сітки із ендотеліальних клітин. Проліферація та диференціація останніх регулюється цілою низкою біологічно активних молекул і в першу чергу залежить від наявності в середовищі мікрооточення поживних субстратів і факторів росту. В попередніх дослідженнях нами було показано стимулюючий ефект проангіогенних цитокінів VEGF та EGF на проліферацію ендотеліальних клітин лінії MAEC [1], проте вплив даних ростових факторів на споживання клітинами трофічних субстратів мікрооточення не вивчалось. Тому метою даної роботи було дослідити проліферативну активність ендотеліоцитів, а також рівень споживання глюкози клітинами MAEC за умов їх преінкубації з вищезазначеними проангіогенними цитокінами та їх антагоністами.

Методи. Ендотеліальні клітини лінії MAEC інкубували в середовищі DMEM (Sigma, США) з додаванням 10% FBS (Sigma, США), 2мМ L-глутаміну та 40 мкг/мл гентаміцину при 37°C, 5% CO_2. Після адаптації клітин до середовища культивування додавали тест-агенти: VEGF (фактор росту ендотеліальних клітин), antiVEGF (специфічні антитіла до VEGF), EGF (епідермальний фактор росту), герцептин та тералок (антагоністи EGF). Інкубація клітин з агентами тривала 48 годин. Проліферативну активність визначали за MTT тестом. Рівень глюкози в середовищі інкубації аналізували з використанням стандартних наборів („Філісіт-Діагностика", Україна).

Результати. Показано збільшення проліферативної активності ендотеліоцитів MAEC на 30%±0,9 ($p<0,05$, порівняно з контролем) в результаті преінкубації з факторами росту VEGF та EGF. Специфічні антитіла antiVEGF відповідно спричиняли зниження проліферації клітин на 55%. Герцептин та тералок, що виступають антагоністами по відношенню до EGF, також викликали зменшення проліферативної активності ендотеліоцитів на 20 і 30 % відповідно, порівняно з контролем (Рис. 1).

Натомість, рівень споживання глюкози клітинами збільшувався на 40 % під впливом VEGF, тоді як antiVEGF викликали зменшення показника на 50%. Проте за умов преінкубації ендотеліоцитів з EGF виявлено зниження рівня споживання глюкози клітинами на 58%. Антагоністи EGF, герцептин та тералок, також викликали зменшення даного показника, хоча й менш виражене – на 40 % (Рис. 2).

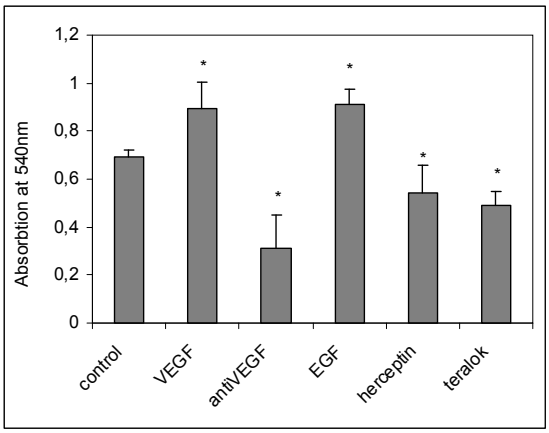


Рис. 1. Вплив VEGF, EGF та їх антагоністів на проліферативну активність ендотеліальних клітин
* - $p < 0,05$ по відношенню до контролю

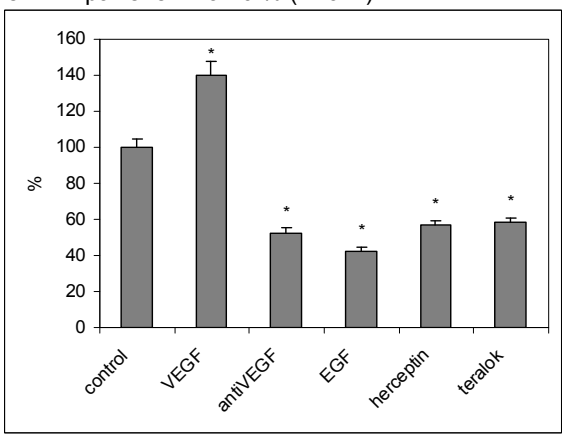


Рис. 2. Вплив VEGF, EGF та їх антагоністів на рівень споживання глюкози ендотеліоцитами в перерахунку на кількість клітин, у %, порівняно з контролем
* - $p < 0,05$ по відношенню до контролю

Для всіх досліджуваних агентів, крім EGF, виявлено однаково спрямований вплив на проліферативну активність та рівень споживання глюкози ендотеліальних клітин. Зменшення споживання глюкози під впливом EGF на фоні його вираженої мітогенної дії представляє інтерес для подальших досліджень. Можливо, спостережуваний ефект пояснюється тим, що мітогенний сигнал EGF пов'язаний з активацією Na^+/H^+-антипорту та скачкоподібним зростанням pH цитоплазми клітин, що в свою чергу спричинило порушення у процесах транспорту глюкози.

Література:

1. *Гарманчук Л.В., Пясковська О.М., Соляник Г.І.* Вплив проангіогенних цитокінів на проліферацію та виживання ендотеліальних клітин // Biopolymers and cell. – 2010. – vol. 26, N 3. – P.187-193.

INFLUENCE OF VEGF AND EGF AND THEIR ANTAGONISTS ON PROLIFERATIVE ACTIVITY AND GLUCOSE CONSUMPTION BY ENDOTHELIAL CELLS

Nikolaenko T.V., Galkovska G.V., Nepiyvoda H.D., Lavrova K.V., Garmanchuk L.V.

ESC „Institute of Biology" Taras Shevchenko KNU, Kyiv, Ukraine
e-mail: liudmylagarmanchuk@rambler.ru

Introduction. One of the promising directions of chemotherapy in the last decades is the inhibition of tumor angiogenesis, the advantages of which are low cytotoxicity against normal tissues and the absence of drug resistance, since the main target of angiogenesis are the endothelial cells. Angiogenesis is a complex multistage process, the final stage of which is the formation of vascular network from endothelial cells. Proliferation and differentiation of them is regulated by a number of biologically active molecules and primarily depends on the presence of nutrient substrates and growth factors in micro-environment. In previous studies we have shown a stimulating effect of pro-angiogenic cytokines VEGF and EGF on proliferation of endothelial cells of MAEC line [1], but influence of these growth factors on the consumption of trophic substrates by cells from microenvironment was not examined. Therefore the aim of this study was to investigate proliferative activity of endotheliocytes and glucose consumption by MAEC cells under the conditions of its pre-incubation with aforementioned pro-angiogenic cytokines and their antagonists.

Methods. Endothelial cells of MAEC line were incubated in DMEM medium (Sigma, USA) supplemented with 10% FBS (Sigma, USA), 2mM L-glutamine and 40 mg/ml gentamicin at 37oC in humidified atmosphere with 5% CO_2. After adaptation of cells to culture medium test-agents were added: VEGF (vascular endothelial growth factor), antiVEGF (antibody specific for VEGF), EGF (epidermal growth factor), herceptin and teralok (antagonists of EGF). Incubation of cells with agents continued 48 hours. Proliferative activity was measured by MTT test. The level of glucose in the incubation medium was analyzed using standard kits (Filisit-Diagnostics, Ukraine).

Results. Increase of the proliferative activity of endotheliocytes MAEC at ≈ 30% as a result of pre-incubation with VEGF and EGF growth factors was shown. AntiVEGF specific antibodies, respectively caused decrease of cells proliferation by 55%. Herceptin and teralok as antagonists of EGF, also caused the decrease in proliferative activity of endotheliocytes 20 and 30% respectively, compared with the control (Fig. 1)

While the level of glucose consumption by cells increased by 40% under the influence of VEGF, whereas antiVEGF caused its decrease by 50%. However, decrease in glucose consumption by cells at 58% under conditions of endotheliocytes pre-incubation with EGF was demonstrated. Antagonists of EGF, herceptin and teralok also caused the decrease of this parameter, though less pronounced - 40% (Fig. 2).

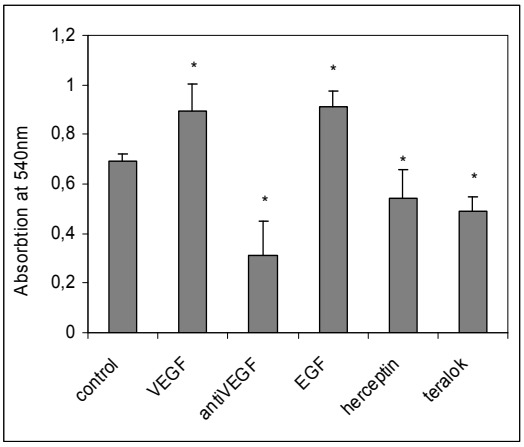


Fig. 1. Influence of VEGF, EGF and their antagonists on proliferative activity of endothelial cells
* - p <0.05 relative to control

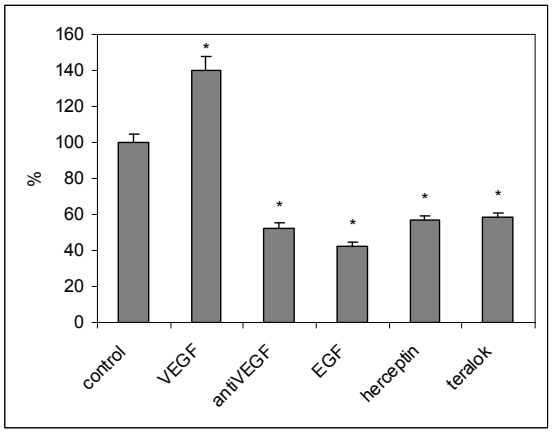


Fig. 2. Influence of VEGF, EGF and their antagonists on endothelial glucose consumption in terms of number of cells in% compared with control
* - p <0.05 relative to control

For all studied agents, except for EGF, the same direction effects on proliferative activity and glucose consumption of endothelial cells were found. Reducing consumption of glucose under the influence of EGF attached to its expressed mitogenic action is of interest for further research. Perhaps the observed effect is explained by the fact that mitogenic signal of EGF is associated with activation of Na^+/H^+-antiport and saltatory increase of pH in cells cytoplasm, which in turn caused a violation of glucose transport process.

References:

1. *Garmanchuk L.V., Pyaskovskaya O.N., Solyanik G.I.* Influence of pro-angiogenic cytokines on proliferation and survival of endothelial cell // Biopolymers and cell. – 2010. – vol. 26, N 3. – P.187-193.

ПРОЯВИ ОКИСНОГО СТРЕСУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЗАПАЛЕННІ І ЗА ДІЇ УЛЬТРАЗВУКУ

Нурищенко Н.Є., Літюга В.В., Борзенко І.О., Трушина В.А.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ "Інститут біології", Київ, Україна
e-mail: nnurish@univ.kiev.ua

Ультразвукова терапія широко застосовується в консервативному лікуванні захворювань, в патогенезі яких присутні прояви окисного стресу. Однак, багаторівневість впливу та остаточно невизначені механізми дії ультразвуку, як фізичного фактору, зумовлюють обмеження сфери його застосування в клінічній практиці. Тому метою дослідження стало з'ясування впливу ультразвуку на ряд показників вільнорадикального окиснення при експериментальному запаленні. Дослідження проведені на моделі каррагінан-індукованого запалення у щурів. Показано, що розвиток каррагінанового запалення супроводжувався змінами біохімічних показників, що вказують на посилення перекисного окиснення ліпідів, збільшення нейтрофільної інфільтрації й зниження антиоксидантного захисту.

Вплив ультразвуку з інтенсивностями 0,1 Вт/см^2 і 0,2 Вт/см^2 сприяв зниженню перекисного окиснення ліпідів і підвищенню ефективності антиоксидантного захисту, зменшенню нейтрофільної інфільтрації при каррагінановому запаленні. Зміни досліджених показників при використанні УЗ із інтенсивністю 0,5 Вт/см^2 вказують на незначне посилення вільнорадикальних процесів. Застосування ультразвуку з інтенсивністю 1,0 Вт/см^2 пов'язано із посиленням вільнорадикального окиснення, зниженням антиоксидантного захисту та збільшенням нейтрофільної інфільтрації у вогнищі запалення.

Зіставивши дані про вплив ультразвуку на величину каррагінанового запалення і біохімічні показники, можна зробити висновок про те, що здатність ультразвуку модифікувати експериментальне запалення пов'язана з його впливом на вільнорадикальне окиснення і систему антиоксидантного захисту. Добре видно, що ультразвук із інтенсивностями 0,1 Вт/см^2 і 0,2 Вт/см^2 пригнічує вільнорадикальні процеси і сприяє підвищенню антиоксидантного захисту. Це веде до зниження величини експериментального запалення. Ультразвук з інтенсивностями 0,5 Вт/см^2 і 1,0 Вт/см^2 викликає посилення вільнорадикальних процесів та виснаження антиоксидантного захисту. Такі зміни, очевидно, не встигають бути своєчасно ліквідовані репараційними системами і стають синергічними до змін клітинного метаболізму, викликаних розвитком запального процесу. Це і є причиною запалення-потенціюючої дії ультразвуку з інтенсивністю 1,0 Вт/см^2.

OXIDATIVE STRESS DISPLAY BY EXPERIMENTAL INFLAMMATION AND WITH INFLUENCE OF ULTRASOUND

Nurishchenko N.E., Lityuga V.V., Borzenko I.A., Trushina V.A.

Taras Shevchenko National University, Kyiv, Ukraine

e-mail: nnurish@univ.kiev.ua

Ultrasound therapy is widely used in conservative treatment of diseases in the pathogenesis of which connected with an oxidative stress. However, multilevel influence and ultimately uncertain mechanisms of ultrasound action, as a physical factor, determins limitations its application in clinical practice. Therefore, the purpose of research was to define the influence of therapeutic ultrasound on free radical oxidation under experimental inflammation.

The studies were performed on a model upper karrageenan inflammation in rats. It was shown that karrageenan swelling accompanied with the biochemical parameters changes indicates increasing of lipid peroxidation, increasing of neutrophilic infiltration and decreasing of antioxidant system under experimental inflammation.

Effect of ultrasound with intensities of 0.1 Wt/sm^2 and 0.2 Wt/sm^2 helped reduce lipid peroxidation and increase antioxidant protection more efficient, reducing neutrophilic infiltration within inflammation. Changes in investigated parameters using ultrasound intensity of 0.5 Wt/sm^2 indicate a slight increase of free radical processes. Application of ultrasound with intensity of 1.0 Wt/sm^2 associated with increase of free radical oxidation, decrease in antioxidant protection and strengthening of neutrophilic infiltration in the focus of inflammation.

By matching data on the impact of ultrasound on the karrageenan inflammation parpameters and biochemical indicators, we can conclude that the ability of ultrasound to modify experimental inflammation is related to its effect on free radical oxidation and antioxidant system.

Thus, the ability of ultrasound to modify karrageenan swelling depending on the ultrasound intensity relate of its influence on free radical oxidation and antioxidant protection. Good shows that ultrasound intensities of 0.1 and 0.2 Wt/sm^2 inhibts free radical processes and enhances antioxidant protection. This leads to decrease of the experimental inflammation parameters.

The ultrasound intensities of 0.5 and 1.0 Wt/sm^2 causes the increasing of free radical processes and antioxidant depletion. Such changes are apparently not able to be promptly eliminated by repairing systems and are synergistic to changes in cellular metabolism caused by the inflammatory process. This is the reason of inflammation-potentialising influence of ultrasound with 1,0 Wt/cm^2 intensity.

НОВІ ІНГІБІТОРИ ГЕПАТИТУ С НА ОСНОВІ КАРБОКСАМІДІВ ФЕНАЗИНУ ТА 1,2,4–ТРИАЗИНОБЕНЗОТІАЗИНУ

[1]Пальчиковська Л. Г., [1]Васильченко О.В., [1]Платонов М.О., [1]Костіна В.Г., [1]Алєксєєва І.В., [2]Рибалко С.Л., [2]Старосила Д.Б., [2]Завелевич М.П., [1]Швед А.Д.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, КиївУкраїна
e-mail: L.Palchykovska@imbg.org.ua
ДУ Інститут Епідеміології та інфекційних захворювань імені Л.В. Громашевського АМН України, Київ, Ukraine
e-mail: butenko@onconet.kiev.ua

За матеріалами ВООЗ, вірусом гепатиту С (HCV), що належить до найнебезпечніших вірусних захворювань, інфіковано близько 180 мільйонів людей по всьому світу. У зв'язку з цим величезні зусилля наукових колективів зосереджені на створенні нових інгібіторів HCV – потенційних лікарських препаратів.

Ми продовжили пошук протигепатитних агентів серед поліциклічних азотвмісних сполук. Розроблені методи синтезу дозволили нам отримати серію з 28 нових 1,2,4-триазинобензотіазинів (ТБТ), заміщених по бензольному кільцю в положенні С-6 або С-8 алкільними, карбоксильними та карбамідними групами, і сполук із модифікаціями в обох фрагментах корового гетероциклу. Таку ж бібліотеку створено з амідів 9-заміщених феназин-1-карбонових кислот (ФКК).

Оскільки одними з основних мішеней в циклі репродукції вірусів для дії антивірусних препаратів вважаються РНК- та ДНК-полімеразні комплекси, *in vitro* тестування синтезованих сполук проводилося в модельному комплексі транскрипції ДНК-залежної РНК-полімерази бактеріофага Т7. Показано, що досліджені препарати ефективно і достовірно інгібують синтез РНК. Розраховані значення показників IC_{50} для 13 сполук серії ТБТ та 14 сполук серії ФКК визначено у межах 4 -60 мкМ.

На моделі каталітичної кишені транскрипційного комплексу Т7 РНКП методом молекулярного докінгу показано спосіб взаємодії синтезованих сполук з рецептором. Ключові міжмолекулярні контакти "ліганд-рецептор" реалізуються за рахунок взаємодій з низкою консервативних амінокислотних залишків, що може перешкоджати процесивним змінам руху доменів ферменту, необхідним для елонгації.

Серед сполук, що активно пригнічували синтез РНК в транскрипційному комплексу Т7 РНКП знайдено низку ефективних інгібіторів вірусу гепатиту С. Найактивнішими виявилися - препарат ТБТ-1 триазинобензотіазинової серії, для якого показник EC_{50} становить 0,15 мкМ, а SI - 833, та препарат ФКК-8 з серії N-ариламідів 9-метилфеназин-1-карбонової кислоти, EC_{50} якого становить 0,05 мкМ, а SI більше 1000. Вірогідною мішенню для цих сполук може бути РНК-полімеразний комплекс вірусу гепатиту С.

NOVEL INHIBITORS OF HEPATITIS C ON THE BASE OF PHENAZINE AND 1, 2, 4-TRIAZINOBENZOTHIAZINE CARBOXAMIDES

[1]Palchykovska L.G., [1]Vasylchenko O.V., [1]Platonov M.O., [1]Kostina V.G., [1]Alexeeva I.V., [2]Rybalko S.L., [2]Starosyla D.B., [2]Zavelevych M.P., [1]Shved A.D.

[1]Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: L.Palchykovska@imbg.org.ua
[2]Public Institution L.V.Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infection Diseases AMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: butenko@onconet.kiev.ua

According to WHO estimations virus hepatitis C (HCV) which belongs to most dangerous diseases are infected around 180 millions of people worldwide. Because of this tremendous effort of the research collectives are focused on design of novel inhibitors of HCV, potential medicinal drugs.

We continued search for anti-hepatitis agents among polycyclic nitrogen-bearing compounds. The developed synthesis method allowed us to obtain series of 28 novel 1,2,4- triazinobenzothiazines (TBT) containing alkyl, carboxyl and carboxamide substituent at the position C-6 or C-8 of benzene ring and compounds with modifications in both fragments of the core heterocycle. The similar library was created from amides 9-substituted phenazine-1- carboxylic acids (PCA).

Since RNA- and DNA-polymerase complexes are thought one of the main targets within the cycle of virus reproduction for action of anti-viral preparations, *in vitro* testing of the synthesized compounds was performed in the model transcription complex of bacteriophage T7 DNA-dependent RNA-polymerase. The examined preparations have been shown to effectively and authentically inhibit RNA synthesis. Calculated IC_{50} index values for 13 compounds from TBT series and 14 compounds from PCA series were determined within 4 - 60 μM range.

The mode of the synthesized compounds interaction with catalytic pocket of the T7 RNA polymerase transcription complex was simulated by the molecular docking method. Key ligand-receptor intermolecular contacts are realized through the interactions with line of conservative amino acid residues and are able to hinder the processive changes of the enzyme domains movement required for elongation.

Among the compounds that are actively suppressing RNA synthesis in T7 RNAP transcription complex a series of effective inhibitors for hepatitis C virus were found. The most active proved to be TBT-1 preparation of triazinobenzothiazine series with EC_{50} values ~0.15 μM, while SI was equal to 833, and preparation PCA-8 from N-arylamides of 9-methylphenazine-1-carboxylic acids series, with EC_{50} value ~ 0.05 μM and SI over 1000. Probable target for these compounds may be RNA polymerase complex of hepatitis C.

СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ТИТРА INF-γ В ОРГАНИЗМЕ ВЛИЯЕТ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГОРМОНАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Перепелицына Е.М., Сидоренко М.В., Гергелюк Т.С.

Отделение биотехнических проблем диагностики Института проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: vodolyb@ukr.net

Клетки молочной железы (МЖ) подвергаются непрерывному воздействию различных факторов, активирущих их пролиферацию, дифференциацию и апоптоз. Существует три основных механизма, индуцирующих гиперплазию МЖ: стимуляция клеточной пролиферации при взаимодействии эстрадиола с эстрогеновым рецептором (ЭР), активация клеточного деления непосредственно ростовыми факторами (чаще всего, эпидермального фактора роста (ЭФР), который может также модулировать транскрипционную активность ЭР), а также регуляция клеточного роста провоспалительными цитокинами (существенная роль пренадлежит интерферону гамма (IFN-γ), который продуцируется Т-лимфоцитами).

Одним из основных способов лечения рака молочной железы (РМЖ), наряду с химио- и лучевой терапией, является гормональное воздействие на чувствительные клетки опухоли. 75% всех опухолей МЖ являются гормоночувствительными, так как экспрессируют рецепторы эстрогена (ЭР) и прогестерона (ПР). Наиболее эффективными препаратами гормонотерапии считаются антиэстрогены, такие как тамоксифен (ТАМ) [1]. Важным критерием эффективности воздействия служит количественная характеристика уровня ПР и ЭР в ткани МЖ под влиянием препарата. Утрата чувствительности к ТАМ через некоторое время может быть связана со снижением количества стероидных рецепторов в опухоли МЖ[2]. В связи с этим возникает необходимость поиска методов влияния на рецепторный статус клеток МЖ.

Недавние исследования показали, что решением этой проблемы может быть использование IFN-γ, который способен регулировать уровень экспрессии ЭР, а также вовлечен в сигнальные пути ЭФР. Данные разных авторов свидетельствуют о противоречивом характере воздействия эндогенного IFN-γ и использования его индукторов на экспрессию ЭР[3]. Поэтому, целью нашей работы было изучения влияния интактных и стимулированных к секреции IFN-γ Т-лимфоцитов, а также рекомбинантного IFN-γ на экспрессию ЭР и пролиферацию в клетках аденокарциномы МЖ, линии MCF-7.

Материалы и методы. Клетки MCF-7 культивировали при стандартных условиях: 37^0 С, 5% CO_2 , 100% влажности, в среде DMEM (Sigma, США), 3,7 мМ L-глутамина (Sigma, США) и 40 мкг/мл сульфата гентамицина (Биофарма, Украина). Для сокультивирования использовали линию клеток МТ-4 (клетки хронического лимфолейкоза человека). Для активации секреции IFN Т-лимфоцитами клетки инкубировали в среде культивирования с иммуногенным препаратом Poly(I):Poly(C) (Sigma, США) в концентрации 0,008 мг/мл. Рекомбинантный IFN-γ добавляли в концентрации 10^{-9} г/мл. Определение ЭР и ЭФР-Р проводили методом иммуноцитохимии, используя хромогены Perma Red и Perma Blue (DAKO, США). Визуализация морфологических изменений проводилась цитологическим методом. Выживаемость клеток определялась с помощью МТТ-теста.

Результаты. При сокультивировании клеток MCF-7 с интактными Т-лимфоцитами (МТ-4 клетки), а так же активированными Т-лимфоцитами, было показано, что после первых суток инкубирования выживаемось клеток в системе культивирования возросла в контроле на 48%, с МТ-4 – на 63%, с МТ-4 активированными - на 67% по сравнению с «0» точкой. После вторых суток инкубации выживаемость клеток возросла в контроле на 7%, с МТ-4 – на 23%, с активированными МТ-4 – на 75% относительно «0» точки. При добавлении рекомбинантного интерферона к культуре клеток MCF-7 выживаемось клеток статичтически не отличалась от контроля. При подсчете клеток было показано, что при сокультивировании клеток MCF-7 с МТ-4 количество живых клеток после 48 часов инкубации возросло на 46% (в суспензионной фракции) и на 67% (в адгезионной фракции)по сравнению с контролем, при сокультивировании с рекомбинантным интерфероном количество клеток возросло на 9% (в суспензионной фракции) и на 60% (в адгезионной фракции) относительно контроля. Иммуноцитологическое исследование показало повышения экспрессии ЭР в клетках MCF-7 при инкубировании их с активырованными к секреции интерферона Т-лимфоцитов.

Заключение. Наши исследования демонстрируют важность способа повышения титра интерферона в организме во время применения комплексной терапии рака молочной железы. Поскольку индукторы интерферона влияют на секреторную активность Т-клеток, то в среду поступает не только IFN-γ, но и большой спектр интерлейкинов (IL-2, 4, 6, 8, 10, 12) и факторов роста, которые в комплексе с IFN-γ способны в большей степени, нежели чистый рекомбинантный интерферон регулировать рост, пролиферацию и экспрессию ЭР в опухолевых клетках МЖ.

Литература:

1. Letrozole Therapy Alone or in Sequence with Tamoxifen in Women with Breast Cancer, The BIG 1-98 Collaborative Group, N Engl J Med, 361:766 Aug. 20, 2009.
2. Адъювантная терапия рака молочной железы: гипотезы и практика Тюляндин С.А., 1998 (РосОнкоВеб).
3. *Sherwin S.A., Mayer D., Ochs J.J. et al.* Recombinant leucocyte a-interferon in advanced breast cancer. Result of a phase II efficacy trial // Ann. Intern. Med. – 1983. – Vol. 98. – P. 598-60.

METHOD FOR INCREASING THE TITER INF- γ IN THE ORGANISM INFLUENCES THE EFFECTIVENESS OF HORMONAL THERAPY OF BREAST CANCER

Perepelitsina E.M., Sydorenko M.V., Gergeliuk T.S.

Department of biotechnological diagnostic problems of the Institute
for Problems of Cryobiology and Cryomedicine National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: vodolyb@ukr.net

Breast cells are subjected to exposure to various factors, that activate their proliferation, differentiation and apoptosis. There are three main mechanisms that induce hyperplasia of the breast tissue: stimulation of cell proliferation in the interaction of estradiol with estrogen receptor (ER), activation of cell division directly by growth factors (most commonly, epidermal growth factor (EGF), which can also modulate the transcriptional activity of ER), and regulation cell growth in pro-inflammatory cytokines (the essential role belongs to interferon gamma (IFN-γ), which is produced by T-lymphocytes).

One of the main ways of breast cancer (BC) treatment is the hormonal influence on sensitive tumor cells along with chemo- and radiotherapy. 75% of all breast tumors are hormone sensitive, because express estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR). The most effective drugs are antiestrogen supplements such as tamoxifen (TAM) [1]. The level of PR and ER expression in breast tissue under the influence of the drug is an important measure of hormone therapy effectiveness. Loss of cell sensitivity to TAM may later be associated with decreasing number of steroid receptors in breast tumors [2]. In this regard, it is necessary to find methods of influence on the receptor status in breast cells.

Recent studies have shown that the solution to this problem may be inframe of influence of IFN-γ on tumor cells, which is able to regulate expression of ER and is involved in signaling pathways of EGF. Work of different authors indicate the contradictory data about effects of endogenous IFN-γ and the use of its inducers on the ER expression [3]. Therefore, the aim of our work was to study the effects of intact T-lymfocytes, stimulated T-lymphocytes and recombinant IFN-γ on the ER expression and proliferation of cells in the breast adenocarcinoma, MCF-7.

Materials and methods. MCF-7 cells were cultured under standard conditions: 37^0C, 5% CO_2, 100% humidity in medium DMEM (Sigma, USA), 3.7 mM L-glutamine (Sigma, USA) and 40 mg / ml gentamicin sulfate (Biopharma , Ukraine). For cocultivation used a cell line MT-4 (human cell chronic lymphocytic leukemia). For activation the secretion of IFN-γ by T-lymphocytes cells were incubated in culture medium with the immunogenic agent Poly (I): Poly (C) (Sigma, USA) at a concentration of 0.008 mg / ml. Recombinant IFN-γ was added at a concentration of 10^{-9} g / ml. Expression of ER and EGF-R was staining by immunocytochemistry using chromogen Perma Red and Perma Blue (DAKO, USA). Cell survival was determined using MTT assay.

Results. After cocultivation MCF-7 cells with intact T-lymphocytes (MT-4 cells) and activated T-lymphocytes it was shown that after the first day of incubation cell survival in the system of cultivation has increased in the control by 48%, with MT-4 - 63%, with MT-4 activated - by 67% compared to the "0" point. After the second day of incubation cell survival increased in the control of 7%, with MT-4 - by 23%, with activated MT-4 - by 75% compared to the "0" point. After adding recombinant interferon to cultured MCF-7 cell survival statistic did not differ from controls. Counting cells has been shown that after cocultivation MCF-7 cells with MT-4 the number of alive cells increased by 46% (in the suspension fraction) and by 67% (in the adhesion fraction) compared with controls after 48 hours of incubation. After cocultivation MCF-7 cells with recombinant interferon the number of cells increased by 9% (in the suspension fraction) and 60% (in the adhesion fraction) compared to controls. ER expression increased in MCF-7 cells after incubation its with activated T-lymphocytes.

Conclusion. Our studies demonstrated the importance of a method for increasing titer of interferon in the organism during use of combined therapy of breast cancer. Since interferon-inductors affect the secretory activity of T-cells in such way that the environment gets not only IFN-γ, but also a wide range of interleukins (IL-2, 4, 6, 8, 10, 12) and growth factors that in combination with IFN -γ are capable to a greater extent to regulate growth, proliferation and expression of ER in breast tumor cells than pure recombinant interferon.

References:

1. Letrozole Therapy Alone or in Sequence with Tamoxifen in Women with Breast Cancer, The BIG 1-98 Collaborative Group, N Engl J Med, 361:766 Aug. 20, 2009.
2. Адъювантная терапия рака молочной железы: гипотезы и практика Тюляндин С.А., 1998 (РосОнкоВеб).
3. *Sherwin S.A., Mayer D., Ochs J.J. et al.* Recombinant leucocyte a-interferon in advanced breast cancer. Result of a phase II efficacy trial // Ann. Intern. Med. – 1983. – Vol. 98. – P. 598-60.

ИЗУЧЕНИЕ БИОЭФФЕКТИВНОСТИ В РЯДУ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ СЕЛЕНОЦИСТЕИНА

[1]Пеховская Т.А., [1]Коваленчик И.Л., [2]Петушок Н.Э., [1]Мойсеенок А.Г.

[1]ГУ НПЦ "Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси", Гродненский филиал, Гродно, Беларусь
e-mail: val@biochem.unibel.by
[2]Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

Селеноцистеин (SeCys) достаточно распространенная аминокислота, функционирующая в качестве редокс-группы в нескольких классах оксидоредуктаз, относящихся к семейству селенопротеинов. SeCys квалифицируется как 21-ая аминокислота, кодируемая при биосинтезе Se-пептида стоп-кодом UGA. Синтез SeCys осуществляется путем взаимодействия двух ферментов: селенофосфат-синтетазы (субстрат моноселенофосфат) и серил-tRNA-трансферазы (субстрат серин – предшественник углеродного скелета SeCys). Образование моноселенофосфата из селенида и АТФ опосредованно образованием фосфорил-фермента, однако оптимальная форма Se для образования селенофосфата все еще остается неясной.

Известно, что для экспрессии Se-протеинов требуется не только достаточный уровень микроэлемента, но и оптимальный носитель Se, который должен соответствовать требованиям биодоступности и биобезопасности. В этой связи, в качестве Se-содержащих субстанций (биокорректоров) БАД или лекарственных форм используются селенит натрия (Se-Na), обогащенные селеном дрожжи (Био-Se) и спирулина (Se-Spir), селенометионин (SeMet), а также ксенобиотические соединения – 2-фенилоктагидроселеноксантен (Se-пиран) или диметилдипиразолилселенид (селекор). Их токсикологические характеристики известны. Основная природная форма – SeMet – характеризуется величиной LD_{50} (крысы, внутрибрюшинно, мг/кг) – 8,8; Se-Na – 6-10; Se-пиран – 725; дрожжевой биоселен (SeMet+SeCys) – 1000; селекор – 8100 мг/кг. Упомянутые Se-содержащие формы были нами изучены с точки зрения их биодоступности и биоэффективности в хроническом эксперименте введения (6 недель).

Исследования проведены на белых крысах-самках линии Wistar, которые содержались на смешанном рационе вивария. Количество потребляемого Se составило 0,2 ppm, что обеспечивало рекомендуемый уровень (0,1-0,3 ppm). Определение активности SeCys-содержащих глутатионпероксидаз (ГПО) с использованием в качестве субстратов H_2O_2 (Кругликова Г.О., Штутман I.М., 1976) и трет-бутилгидропероксида – tBH (Моин В.М., 1986) подтвердило известную иерархию активности изофермента: с субстратом H_2O_2 – 12-перстная кишка > тонкая кишка > толстая кишка = печень = эритроциты > скелетные мышцы; с субстратом tBH – печень > эритроциты > 12-перстная кишка = тонкая кишка > толстая кишка > скелетные мышцы. Соотношение активности изоформ ГПО по двум субстратам в плазме крови составило 1:3 - 1:6 в пользу tBH.

Все исследованные субстанции Se обладали высокой степенью биодоступности, несмотря на то что селекор и Se-пиран практически не всасывались в кровяное русло. При назначении соединений Se в физиологических дозах (10 мкг/кг) выявлена активация обеих изоформ ГПО, менее выраженная в слизистой оболочке кишечного тракта и более выраженная в печени, скелетных мышцах и эритроцитах. В качестве предполагаемого инициатора биосинтеза SeCys и селенопротеинов использовали метод 24-часовой эндогенной интоксикации. Введение подопытным животным бактериального липополисахарида (ЛПС, 400 мкг/кг, внутрибрюшинно) приводило преимущественно к падению активности tBH-метаболизирующей ГПО в тонком кишечнике, печени, скелетных мышцах и эритроцитах у животных, не получавших соединения Se. Данное снижение предупреждалось предшествующим потреблением Se-содержащих субстанций. На фоне 25-кратного увеличения профилактических доз Se-Na, селекора, Se-пирана или Se-Met (250 мкг Se/кг, внутрижелудочно, 10 дней) выявлен сходный защитный эффект при эндогенной интоксикации, вызванной ЛПС.

Установлено, что модель недостаточности Se у белых крыс, оцениваемая по динамике активности ГПО в тканях и уровню селенемии, достигается при 2-кратном назначением $AlCl_3$ в дозе 190 мг/кг.

Полученные результаты свидетельствуют, что Se-содержащие субстанции обладают высокой биоэффективностью при длительном назначении физиологических доз микроэлемента.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГКПНИ "Биологическая инженерия и биобезопасность, 2006-2010", задание 33.

Литература:

1. *А.Г. Мойсеенок, Е.В. Пестюк, Е.А. Мойсеёнок* // Селен, селеноаминокислоты, селенопротеины: биодоступность, биосинтез, биохимические функции – В сб. "Питание и обмен веществ" (ред. А.Г. Мойсеёнок) – Гродно, 2002. – С.70-98.
2. *Н.Э. Петушок, Т.А. Пеховская, А.А. Шевалье, К.И. Жакова, А.Г. Мойсеенок* // Эффекты органических субстанций селена в желудочно-кишечном тракте крыс – Весцi НАН Беларусi (Сер. мед. навук). – 2006. – №2. – С.76-79.
3. *А.Г. Мойсеенок, Н.Э. Петушок, Т.А. Пеховская, Г.В. Альфтан* // Активирование и ингибирование глутатионпероксидаз тканей при курсовом назначении толерантной дозы неорганических и органических носителей селена – В сб. "Селекор. Биологическое действие" (ред. И.В. Саноцкий) – Москва, 2006. – С.158-167.

STUDIES ON BIOEFFICIENCY IN SERIES OF SELENOCYSTEINE PRECURSORS

[1]Pekhovskaya T.A., [1]Kovalenchik I.L., [2]Petushok N.E., [1]Moiseenok A.G.

[1]Institute of Pharmacology and Biochemistry, NAS of Belarus, Grodno Branch, Grodno, Belarus
e-mail: val@biochem.unibel.by
[2]Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Selenocysteine (SeCys) is a sufficiently distributed amino acid functioning as a redox group in several classes of oxidoreductases in the selenoprotein family. SeCys is classified as the 21st amino acid encoded during Se-peptide biosynthesis by UGA stop-code. SeCys synthesis is brought about by interaction of two enzymes: selenophosphate synthetase (monoselenophosphate as substrate) and seryl-tRNA-transferase (serin, precursor of the SeCys carbohydrate skeleton as substrate). Formation of monoselenophosphate from selenide and ATP is mediated through formation of phosphoryl enzyme. However, Se optimal form for formation of selenophosphate is still unclear.

It is known that to express Se-proteins, not only a sufficient level of the trace element is required, but also an optimum Se carrier which must meet bioavailability and biosafety requirements. In this connection, sodium selenite (Se-Na), selenium-enriched yeast (Bio-Se) and spirulline (Se-Spir), selenomethionine (SeMet) as well as the xenobiotic compounds, 2-phenyl octahydroselonoxanthene (Se-pyrane) or dimethyldipyrazolyl selenide (selecor), are used as Se-containing substances (biocorrectors), BAN or drug dosage forms. Their main toxicologic characteristics are known. LD50 (rats, intraperitoneal) for SeMet as main natural form is 8,8; Se-Na – 6-10; Se-pyrane – 725; selenium-enriched yeast (SeMet+SeCys) – 1000; selecor – 8100 mg/kg. We studied the above Se-containing forms in relation to their bioavailability and bioefficiency in a chronic experiment treatment (6 weeks).

The studies were carried out on female Wistar albino rats fed a mixed laboratory diet. The amount of Se consumed was 0.2 ppm, which provided the recommended level (0.1-0.3 ppm). Determination of SeCys-containing glutathione peroxidases (GPO) using H_2O_2 (Kruglikova G.O., Shtutman I.M., 1976) and tret-butylhydroperoxide – tBH (Moin V.M., 1986) as substrates confirmed the known hierarchy of isoenzyme activities: duodenum > small intestine > large intestine = liver = erythrocytes > skeletal muscles with H_2O_2 as substrate; liver> erythrocytes > duodenum = small intestine > large intestine > skeletal muscles with tBH as substrate. For the two substrates, the ratio of blood plasma GPO isoform activities was 1:3-1:6 in favor of tBH.

All the studied Se-substances had high bioavailability extent, disregarding the fact of selecor and Se-pyrane not essentially absorbing in the bloodstream. When Se compounds were given at physiologic doses (10 µg Se/kg), activation of both the GPO isoforms was found, which was less pronounced in the intestinal mucosa and more pronounced in the liver, skeletal muscles and erythrocytes.

The method of 24-hour endogenous intoxication was used as a tentative initiator of SeCys and selenoprotein biosynthesis. The administration of bacterial lipopolysaccharide (LPS, 400 µg/kg, intragastrically) caused a primary decrease of tBH-metabolizing GPO activity in small intestine, liver, skeletal muscles and erythrocytes. This decrease was prevented by previous consumption of Se-containing substances. The 25-fold increase of the preventive doses of Se-Na, selecor, Se-pyrane or SeMet (250 µg Se/kg, intragastrically, 10 days) showed a similar protective effect in LPS-induced endogenous intoxication.

It was found that the model of Se deficiency in albino rats, as revealed by the dynamics of tissue GPO activity and selenemia level, was attained by 2-fold $AlCl_3$ administration.

The results obtained indicate that Se-containing substances had high bioefficiency during long-term consumption of physiologic doses of the trace element.

The work was supported by the State Comprehensive Scientific Program "Biological Engineering and Biosafety 2006-2010",assignment 33.

References:

1. *A.G. Moiseenok, E.V. Pestuk, E.A. Moiseenok* // Selenium, selenoamino acids and selenoproteins: bioavailability, biosynthesis and biochemical functions. – Nutrition and metabolism (Rus.) / Prof. A.G. Moiseenok, editor.– Grodno, 2002. – P.70-98.
2. *N.E. Petushok, T.A. Pekhovskaya, A.A. Shevalye, K.I. Zhakova, A.G. Moiseenok* // Effects of organic selenium substances in the rat gastrointestinal tract. – Proceedings of NAS of Belarus (Med. ser.) (Rus.). – 2006. – N2. – P.76-79.
3. *A.G. Moiseenok, N.E. Petushok, T.A. Pekhovskaya, G.V. Alftan* // Activation and inhibition of glutathione peroxidases in mammal tissues with course administration of tolerant doses of non-organic and organic selenium carriers. – SELECOR. Biological effects (Rus) / Prof. I.N. Sanotski, editor. – Moscow, 2006. – P. 158-167.

ИНДУКЦИЯ АПОПТОЗА В КЛЕТКАХ JURKAT ПРИ ДЕЙСТВИИ КВЕРЦЕТИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Фильченков А.А., Завелевич М.П.

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина, e-mail: apoclub@i.ua

Соединения природного происхождения, которые относятся к разным классам флавоноидов, способны индуцировать апоптоз и дифференцировку лейкозных клеток, а также модифицировать действие цитотоксических противоопухолевых препаратов. Среди этих соединений – кверцетин, относящийся к флавонолам. Хотя имеется значительное количество работ по цитотоксическим эффектам и индукции апоптоза кверцетином в опухолевых клетках, остаются недостаточно исследованными вопросы о связи между структурой флавонолов, в частности родственных кверцетину соединений, и их способности индуцировать апоптоз. Ранее нами [1] было показано, что существует зависимость между наличием и положением ряда заместителей в молекулах родственных флавоноидных соединений и их способностью к индукции апоптоза в опухолевых клетках, не коррелирующей с уровнем антиоксидантной активности этих соединений. Недостаточно изучено и влияние гликозилирования эффекты кверцетина в отношении опухолевых клеток.

Цель настоящего исследования заключалась в анализе цитотоксической и апоптогенной активности кверцетина в сравнении с изокверцетином (кверцетин-3-глюкозидом) и гликозидом 3,7-диметиликверцетина.

В работе использовали кверцетин фирмы Merck & Co., Inc. (США), изокверцетин фирмы Aldrich (США) и гликозид 3,7-диметиликверцетина, выделенный и очищенный из экстракта диких злаков *Deschampsia caespitosa* L. и *Calamagrostis epigeios* L. (Экофарм, Украина). Клетки Т-лимфобластного лейкоза человека линии Jurkat (клон Е6-1), полученные из банка клеточных линий ИЭПОР, выращивали в стандартных условиях. Маточные растворы всех исследуемых флавоноидов готовили на этаноле. Содержание клеток с гиподиплоидной ДНК и распределение по фазам клеточного цикла исследовали с помощью проточной цитометрии клеток, пермеабилизованных тритоном Х-100 и окрашенных пропидия иодидом. Содержание клеток с активной формы каспазы-3 изучали, используя набор "Caspase-3, Active Form, mAb Apoptosis Kit: FITC" (BD Bioscience Pharmingen, США).

Изокверцетин и кверцетин были в равной степени эффективными в отношении торможения роста, цитотоксического эффекта и индукции апоптоза в культуре клеток Jurkat (величина EC_{50} при 48-часовой инкубации составляла 60 мкмоль/л для кверцетина, а для изокверцетина она превышала 80 мкмоль/л), хотя развитие апоптоза при действии изокверцетина наступало на сутки позднее. Вместе с тем изокверцетин вызывал увеличение содержания клеток в фазе G_0/G_1, в отличие от кверцетина, для которого характерным была индукция существенного блока митотического цикла в фазе G_2/M. Токсичность гликозида 3,7-диметиликверцетина была гораздо ниже таковой кверцетина и изокверцетина. Гликозид 3,7-диметиликверцетина в дозе 150 мкмоль/л вызывал задержку пролиферации, что не сопровождалось массовой индукцией апоптоза. Апоптоз при действии гликозида 3,7-диметиликверцетина в высоких дозах отмечали не ранее, чем на 3-е сутки после начала инкубации. Вклад каспазы-3 в развитие апоптоза, вызванного гликозидом 3,7-диметиликверцетина, был относительно невелик в сравнении с таковым при действии кверцетина. Несмотря на торможение роста клеток в высоких концентрациях, гликозид 3,7-диметиликверцетина не вызывал изменений в распределении по фазам цикла, что резко контрастирует с фазо-специфичными эффектами кверцетина и изокверцетина.

Особый интерес представило обнаружение значительного повышения чувствительности клеток Jurkat к действию типичного индуктора апоптоза вепезида при предварительной инкубации клеток с нетоксичными концентрациями гликозида 3,7-диметиликверцетина, чего не отмечали при действии кверцетина.

Таким образом, метилирование или гликозилирование кверцетина существенно изменяют его токсичность, апоптоз-индуцирующую активность и специфичность в отношении прохождения цикла на клетках Т-лимфобластного лейкоза Jurkat. Значительное усиление чувствительности клеток, обработанных гликозидом 3,7-диметиликверцетина, к индукции апоптоза вепезидом, свидетельствует о перспективности этого соединения как модификатора действия цитотоксических противоопухолевых препаратов.

Литература:

1. *Фільченков О. О., Завелевич М. П.* // Порівняльний аналіз проходження клітинного циклу та індукції апоптозу в клітинах МТ-4 гострої лімфобластної лейкемії людини за дії флавоноїдів. – Український біохімічний журнал, 2009, Т. 81, № 5, С. 24-30.

INDUCTION OF APOPTOSIS IN JURKAT CELLS BY QUERCETIN AND RELATED SUBSTANCES

Philchenkov A.A., Zavelevich M.P.

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: apoclub@i.ua

Natural substances belonging to various classes of flavonoids are capable of inducing apoptosis and differentiation of leukemic cells as well as modify the activities of the cytotoxic anticancer drugs. Quercetin as a representative of flavonols is one of such substances. In spite of numerous studies on cytotoxicity of quercetin and apoptosis induction, the relations between the structure of quercetin-related substances and their ability of apoptosis induction has not been elucidated in details. Earlier, we have demonstrated the relation between certain substituting groups in the molecules of flavonoids and apoptosis-inducing properties that are not correlated with antioxidant activities of these substances [1]. One more question that remains unsolved is the effects of glycosylation on antitumor activities of quercetin and related substances.

The aim of the study was to analyze apoptogenic activity and cytotoxicity of quercetin comparing with isoquercetin (quercetin 3-O-beta-D-glucoside) and 3,7-dimethyl quercetin glycoside.

Quercetin was purchased in Merck & Co., Inc. (USA), isoquercetin in Aldrich (USA). 3,7-dimethyl quercetin glycoside was purified from the extract of *Deschampsia caespitosa* L. and *Calamagrostis epigeios* L. grasses (Ecopharm, Ukraine). Jurkat cells (E6-1 clone) obtained from cell line depository of IEPOR were cultured according to the conventional techniques. The stock solutions of the flavonoids under study were prepared in ethanol. The percentage of hypodiploid cells and cell cycle distribution were assessed by flow cytometry of cells permeabilized by Tryton X-100 and stained with propidium iodide. The active form of caspase-3 was assayed in cells with the aid of “Caspase-3, Active Form, mAb Apoptosis Kit: FITC” (BD Bioscience Pharmingen, USA).

Isoquercetin and quercetin were both equally active in inhibiting cell growth, cytotoxicity and apoptosis induction in Jurkat cells (EC_{50} for 48 h 60 μm for quercetin and above 80 μm for isoquercetin). Nevertheless, apoptosis induced by isoquercetin was delayed by one day as compared with that induced by quercetin. Contrary to G_2/M arrest characteristic of quercetin, isoquercetin demonstrated the increase of cell percentage in G_0/G_1 phase. As to 3,7-dimethyl quercetin glycoside, its toxicity was much less as compared with that of quercetin or isoquercetin. At a dose as large as 150 μm, 3,7-dimethyl quercetin glycoside only inhibited cell proliferation with relatively small cell death and relatively small activation of caspase-3. In spite of inhibition of cell proliferation at high doses and induction of cell death, the cell cycle patterns upon treatment with 3,7-dimethyl quercetin glycoside were unaltered in contrast to that in case of quercetin or isoquercetin.

It should be noted that preceding incubation with nontoxic concentrations of 3,7-dimethyl quercetin glycoside largely enhanced the sensitivity of Jurkat cells by apoptosis induced by vepeside. Such enhancement effect was not evident when quercetin was used.

To summarize, methylation or glycosilation of quercetin affect significantly the toxicity, apoptosis-inducing ability and cycle phase-specificity of the substance when assayed in Jurkat cells of acute T cell lymphoblastic leukemia. The phemomenon enhancement of cell sensitivity towards apoptosis induction suggests that 3,7-dimethyl quercetin glycoside may be promising as a modifier of cytotoxic anticancer drugs.

References:

1. *Philchenkov A. A., Zavelevych M. P.* Comparative effects of flavonoids on cell cycle distribution and apoptosis in human acute lymphoblastic leukemia MT-4 cells. Ukr. Biokhim. Zh. 2009; 81 (5): 24-30 (in Ukrainian).

БЕТА-ДЕФЕНСИН ЧЕЛОВЕКА – НОВЫЙ АУТОАНТИГЕН ПРИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

[1]Погребной П., [2]Бобык В., [1]Зеленый С., [1]Солдаткина М., [1]Журавель Е., [2]Капустян Л., [3]Рябенко Д.,[2]Сидорик Л.

[1]Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина, e-mail: pipo@onconet.kiev.ua
[2]Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина
[3]Национальный научный центр Институт кардиологии им.акад. М.Д. Стражеско АМН Украины, Киев, Украина

Кардиомиоциты отвечают на воздействие стресса индукцией программы запрограммированной клеточной гибели – апоптоза либо некроза, зависящих от пула регуляторных белков (таких как молекулярные шапероны (HSPs), белки семейства Bcl-2, факторы роста и др.) и от баланса между биосинтезом и деградацией белков в клетке. Запрограммированная клеточная гибель кардиомиоцитов отличается от таковой для других типов клеток как на морфологическом, так и на биохимическом уровнях.Клеточная смерть проявляется в уменьшении количества каордиомиоцитов, что есть основным патогенетическим фактором в развитии сердечной недостаточности и индукции патологических аутоиммунных процессов, характерных для прогрессии данной патологии.

Множество данных последних лет поддерживают идею о тесной взаимосвязи апоптоза и ауто иммунных процессов, поэтому поиск и идентификация факторов, функционально объединяющих эти процессы, является одной из центральных проблем современной биомедицины.

Дефенсины – семейство низкомолекулярных катионных пептидов, продуцируемых большинством клеток и имеющим антимикробную, антивирусную и антимикозную активности, и играющим важную роль в регуляции врожденного и адаптивного иммунного ответа через активацию экспрессии цитокинов и регуляцию стресс-индуцируемого сигналинга. Изменения экспрессии и биологической активности дефенсинов были обнаружены при различных патологиях, от рака до ишемической болезни сердца, на основании чего данные пептиды представляют практический интерес как новые перспективные естественные антибиотики.

Нами исследована возможная роль бета-дефенсина-2 человека (hBD-2) как аутоантигена при хронической стадии развития сердечной недостаточности, которая проявляется в прогрессии дилятационной кардиомиопатии (ДКМ). Иммуноскрининг сывороток пациентов с ДКМ методом ELISA показал, что 68% исследованных сывороток были антитело-позитивными и имели существенно и достоверно более высокий уровень специфических анти-hBD-2 аутоантител в сравнении с сыворотками пациентов с ишемической борлезнью сердца и со здоровыми донорами. В то же время данные сыворотки были и антитело-позитивными против шаперонина Hsp60, который считается одним из основных анти-апоптозных белков кардиомиоцитов.

С помощью Вестер-блот анализа мы обнаружили увеличение экспрессии hBD-2 в лизатах миокарда, пораженного ДКМ, в сравнении с нормальным миокардом. Методом иммунопреципитации нами идентифицировано формирование *in vivo* hBD-2-Hsp60 комплекса в цитоплазматической фракции кардиомиоцитов как нормального, так и патологического миокарда.

Возможная роль и особенности формирования данного комплекса в прогрессии сердечной недостаточности являются предметом дальнейших исследований.

HUMAN BETA-DEFENSIN – A NEW AUTOANTIGEN AT HEART FAILURE

[1]Pogribnyy P., [2]Bobyk M., [1]Zelenyi S., [1]Soldatkina M., [1]Zhuravel E., [2]Kapustian L., [3]Ryabenko D., [2]Sidorik L.

[1]Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
[2]Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
[3]Strazhesko Institute of Cardiology MAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: sidorik@imbg.org.ua

Cardiomyocytes respond to stress by induction of cell death program – apoptosis or necrosis depending from subset of regulatory proteins involved (such as molecular chaperons (HSPs), Bcl-2 family of proteins, growth factors, calcium and oxidants) and from the balance between biosynthesis and degradation of proteins within the cell. The programmed cell death in cardiomyocytes is differing at morphological and biochemical levels from other types of cell. Cell death manifested in cardiomyocytes loss could be a major pathogenic factor in heart failure development and induction of pathologic autoimmunity which characterized of such pathology progression.

During the last decade the numerous data accumulated have supported the idea of a close link between apoptosis and autoimmunity, and identification of possible connecting-link factors is a central problem for molecular medicine.

Defensins – are low molecular weight cathionic peptides produced by number of cells and possesses antimicrobial, antiviral and antifungal activities which play an important role in regulation of innate and adaptive immunity via activation of cytokines expression and regulation of stress-induced signalling. Recently the changes in expression and activities of defensins have been shown at different human pathologies including cancer and ischemic heart disease and such peptides were proposed as new perspective naïve antibiotic.

We studied the possible role of human beta-defensin-2 (hBD-2) as autoantigen at chronic stage of heart failure manifestated in dilated cardiomyopathy (DCM). Immunoscreening of DCM patients sera revealed that 68% of sera investigated were antibody-positive and had significantly higher level of specific anti-hBD-2 autoantibodies in comparison with ischemic sera and normal ones. In the same time such sera were antibody positive against heat shock protein Hsp60 which proposed now as a major anti-apoptotic protein of cardiomyocytes.

Using Western-blot analysis we shown the increased expression of hBD-2 in lyzates obtained from heart samples affected by DCM in comparison with normal myocardium. The immunoprecipitation assay identified in vivo hBD-2-Hsp60 complex formation in cytoplasmic fraction of cardiomyocytes.

The possible role of hBD-2 as a natural link between adaptive an innate immunity at heart failure development will be discussed.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА АВРАНА ЛЕКАРСТВЕННОГО НА КРЫСАХ С ПЕРЕВИТОЙ ОПУХОЛЬЮ ПЕЧЕНИ РС-1

Полуконова Н.В., Меркулова Е.П., Дурнова Н.А., Романтеева Ю.В., Бородулин В.Б.

Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского, Саратов, Россия
e-mail: ecoton@rambler.ru, yuliyarom81@mail.ru

Общей чертой биофлавоноидов служит наличие ароматического ядра с одной или несколькими гидроксильными группами, определяющим их антиоксидантные свойства. Цель: исследование антиоксидантной активности очищенного флавоноидсодержащего экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis*) при исследовании белых лабораторных крыс с перевитой опухолью печени РС-1.

Приготовление очищенного спиртового экстракта аврана лекарственного проводили из сухого сырья. Первая группа крыс с перевитой опухолью печени в течение 1 месяца получали экстракт аврана. Другая группа крыс с перевитой опухолью печени экстракт не получала. Для определения в крови забитых по окончании эксперимента животных малонового диальдегида (МДА); каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) использованы стандартные методики (Артюхов, 2000). Определение активности каталазы в эритроцитах крови животных проводилось спектрофотометрическим методом.

Были получены следующие результаты: МДА – 5.248 ммоль/л (в контроле 1.933 ммоль/л); каталаза – 0.369 МЕ (в контроле 0.175 МЕ); СОД – 7.188 МЕ (в контроле 4.527 МЕ). В эксперименте с авраном наблюдалось повышение МДА на 171% относительно контроля, что свидетельствует о разрушении эритроцитарных мембран под действием активных форм кислорода, несмотря на то, что активность ферментов антиоксидантных систем так же возросла: каталазы на 111%, СОД на 59%.

Увеличение перекисного окисления липидов (ПОЛ) может служить защитным механизмом, усиливающим апоптоз раковых клеток. А усиление активности антиоксидантных ферментов, в этом случае носит компенсаторный характер.

Литература:

1. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под редакцией В. П.Фисенко. Москва. 2000 г. 378 с.
2. *Areias F.M., Rego A.C., Oliveira C.R., Seabra R.M.* Antioxidant effect of flavonoids after ascor-bate/Fe^{2+}-induced oxidative stress in cultured retinal cells // Biochem. Pharmacol, 2001, Vol. 62. P. 111-118.

THE RESEARCH OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF GRATIOLA OFFICINALIS EXTRACT CONTAINED SUM OF FLAVONOIDS ON LABORATORIAL RATS WITH TUMOR OF LIVER PC-1

Polukonova N., Merkulova E., Durnova N., Romanteeva Yu., Borodulin V.B.

Saratov State Medical University n.a. V.I.Razumovsky, Saratov, Russia
e-mail: ecoton@rambler.ru, yuliyarom81@mail.ru

The aromatic nucleus with one or several hydroxyl groups is general trait of bioflavonoids, which determine a antioxidant activity.

The antioxidant activity of *Gratiola officinalis* extract researched on laboratorial rats with tumor of liver PC-1.

We used standard procedures for determination malonic dialdehyde, catalase, superoxide scavenger (Artyukhov, 2000). The catalase activity in red blood cells of laboratory animals defined by spectrophotometric method.

The results: MDA – 5,248 mmol/l (control – 1,933 mmol/l); catalase – 0,369 ME (control – 0,175 ME); superoxide scavenger – 7,188 (control – 4,527 ME).

The level of MDA on 171 % in comparison with control was increased. The catalase activity rise on 111% and superoxide scavenger activity – on 59%. The prooxydant effect of *Gratiola officinalis* extract observe of test animals with tumors.

The increase level of lipids peroxidation is protective mechanism initiated apoptosis of cancer cells. The increase in activity of antioxidant enzymes is compensatory action.

References:

1. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под редакцией В. П.Фисенко. Москва. 2000 г. 378 с.
2. *Areias F.M., Rego A.C., Oliveira C.R., Seabra R.M.* Antioxidant effect of flavonoids after ascor-bate/Fe^{2+}-induced oxidative stress in cultured retinal cells // Biochem. Pharmacol, 2001, Vol. 62. P. 111-118.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПЕКТИНОВЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Попов С.В., Оводов Ю.С.

Учреждение Российской академии наук Институт физиологии
Коми научного центра Уральского отделения РАН, Сыктывкар, Россия
e-mail: popov@physiol.komisc.ru

Пектины представляют собой сложные гетерополисахариды, которые входят в состав клеточных стенок и межклеточного пространства высших наземных растений, морских трав и ряда пресноводных водорослей. Макромолекула пектинов включает в себя фрагменты линейной и разветвленной областей, которые образованы такими полисахаридами, как гомогалактуронан, рамногалактуронан-I, ксилогалактуронан и апиогалактуронан. Действие на иммунную систему более 20 пектинов с различным типом строения углеводной цепи изучено с целью выявления зависимости иммуномодулирующей активности от структуры пектиновой макромолекулы.

Скрининг пектиновых полисахаридов растений европейского Севера России выявил пектины, способные стимулировать или подавлять иммунную реактивность лабораторных мышей при пероральном введении. Обнаружено, что пектины с содержанием остатков галактуроновой кислоты более 80 % уменьшают активность макрофагов и ингибируют реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). К таким пектинам относятся: гераклеуман, пектин борщевика сибирского; потамогетонан, пектин рдеста плавающего; оксикоккусан, пектин ягод клюквы обыкновенной и раувольфиан, пектин каллуса раувольфии змеиной. Фрагменты пектинов, лишенные разветвленных областей рамногалактуронана-I или апиогалактуронана (содержание остатков галактуроновой кислоты 98-100%), были получены с помощью частичного кислотного гидролиза пектинов. Обнаружено, что галактуронаны снижают реактивность макрофагов и ингибируют реакцию ГЗТ независимо от того, обладают такой способностью исходные пектины или нет. В частности, галактуронановые фрагменты потамогетонана, оксикоккусана и раувольфиана также, как исходные пектины, уменьшают активность лейкоцитов. Высокая степень метилэтерифицирования остатков галактуроновой кислоты (более 50%) препятствует ингибирующему действию пектинов на активность лейкоцитов. Наличие блоков разветвленного галактуронана вызывает двухфазный характер иммуномодулирующего действия пектина – снижение лейкоцитарной активности сменяется ее увеличением. Способностью снижать иммунную реактивность обладают пектины и галактуронаны с молекулярной массой свыше 300 кДа. Показано, что пектины и галактуронаны, снижающие активность лейкоцитов, повышают резистентность лабораторных мышей при эндотоксинемии, вызванной инъекцией липополисахарида, а также защищают стенку толстой кишки от воспаления, вызванного уксусной кислотой. Пектины, имеющие развитую разветвленную область, такие как лемнан, пектин ряски малой, бутомосан, пектин сусака зонтичного, и силенан, пектин смолевки обыкновенной, стимулируют неспецифические (фагоцитоз) и антиген-специфические клеточные иммунные реакции (ГЗТ, продукция антител). Иммуностимулирующее действие исследованных пектинов вызывается макромолекулами с молекулярной массой 20-100 кДа. Тонкое строение боковых углеводных цепей пектинов определяет их иммуностимулирующую способность. Силенан и танацетан, пектин пижмы обыкновенной, имеют близкое строение, однако силенан стимулирует фагоциты, тогда как танацетан не обладает такой способностью. Обнаружено, что разветвленная область силенана представлена в основном линейными 1,4-связанными бета–галактановыми и 1,5-альфа–арабинановыми цепями, тогда как боковые углеводные цепи танацетана содержат в большом количестве разветвленные блоки арабинана и галактана. Показано, что разветвленный фрагмент макромолекулы лемнана (апиогалактуронан) обуславливает иммуноадъювантное действие данного пектина. Стимуляция гуморального иммунного ответа лемнаном происходит в результате увеличения проницаемости кишечной стенки для антигена.

Таким образом, пектины обладают широким спектром иммуномодулирующего действия, характер которого определяется преобладанием высокомолекулярного линейного галактуронана или низкомолекулярных разветвленных областей пектиновой макромолекулы. Пектины, находящиеся в клеточной стенке растений, имеют потенциальную возможность, как к иммуностимулирующему, так и к иммуносупрессорному действию. Полученные результаты служат обоснованием для выбора способа получения пектинов с заданной иммуномодулирующей активностью, а также открывают новое направление в иммуномодулирующей терапии - манипулирование составом пектиновых фрагментов в желудочно-кишечном тракте человека.

IMMUNOMODULATORY EFFECT OF PECTIC POLYSACCHARIDES

Popov S.V., Ovodov Yu.S.

Institute of Physiology, Komi Science Centre, The Urals Branch of the Russian Academy of Sciences,
Syktyvkar, Russia
e-mail: popov@physiol.komisc.ru

Pectins are well known to be complicated heteropolysaccharides which comprise cell wall and intercellular matrix of higher land plants, sea grasses and some freshwater algae. The pectin macromolecule has been shown to contain fragments of linear and branched areas consisted of polysaccharides as follows: homogalacturonan, rhamnogalacturonan-I, xylogalacturonan and apiogalacturonan. The effect on the immune system of more than 20 pectins of various structural features was investigated to elucidate dependence of immunomodulatory activity on structure of pectin macromolecule.

Pectins possessing immunostimulating or immunodepressing activity at oral administration to laboratory mice were discovered as a result of screening of pectic polysaccharides of plants of the European North of the Russia. Pectins contained of 80% and more of residues of galacturonic acid were found to decrease activity of macrophages and to inhibit reaction of delayed type hypersensitivity (DTH). Such pectins are: heracleuman, potamogetonan, oxycoccusan and rauvolfian isolated from hogweed *Heracleum sibiricum*, pondweed *Potamogeton natans*, cranberry *Oxycoccus palustre* and callus of snakeroot *Rauvolfia serpentine,* respectively. Pectin fragments deprived of branched rhamnogalacturonan-I and apiogalacturonan areas (content of residues of galacturonic acid 98-100%) were obtained using partial acidic hydrolysis of pectins. Galacturonans obtained were shown to decrease activity of macrophages and to inhibit DTH independent of immunomodulating capacity of whole pectins. For example, galacturonanic fragments of potamogetonan, oxycoccusan and rauvolfian were found to diminish activity of leukocytes similar to parent pectins. High degree of methylesterification of the galacturonic acid residues (more than 50%) was established to interrupt inhibitory effect of pectins on leukocyte activity. The presence of fragments of branched galacturonan was found to induce biphasic immunomodulatory action, namely decrease of leukocyte activity changes to increase of that. Molecular weight of immunodepressing pectins and galacturonans was estimated to be more than 300 kDa. Pectins and galacturonans with leukocyte-inhibiting capacity were shown to increase resistibility of laboratory mice at endotoxinemia induced by injection of lipopolysaccharide and were found to protect mice against colonic inflammation induced by acetic acid. Pectins with advanced branch area such as lemnan from duckweed *Lemna minor*, butomosan from grass rush *Butomus umbellatus* and silenan from campion *Silene vulgaris* were found to stimulate antigen-nonspecific (phagocytosis) and antigen-specific (DTH, production of antibodies) immune reactions. Macromolecules of molecular weight 20-100 kDa were shown to mediate the immunostimulating effect of these pectins. The fine structural features of side carbohydrate chains are assumed to determine immunostimulatory activity of pectins. Silenan and tanacetan, pectin of common tansy *Tanacetum vulgare* were established to be of similar monosaccharide composition. However, silenan was found to stimulate phagocytes whereas tanacetan failed to influence on phagocytes. Branched area of silenan was found to consist mainly of linear 1,4-linked beta-galactan and 1,5-alpha-arabinan chains, whereas tanacetan was shown to contain considerable parts of branched fragments of arabinan and galactan in the side carbohydrate chains. Branched apiogalacturonanic fragment of macromolecule was established to be involved in the immunoadjuvant effect of lemnan. Increase of intestinal permeability for antigen was found to mediate stimulation of humoral immune response by lemnan.

Thus, pectins were shown to demonstrate a wide spectrum of immunomodulatory activity, specifity of that depends on prevalence of linear galacturonan of high molecular weight or branched areas of pectic macromolecule with lower molecular weight. Pectins of the native plant cell wall appeared to posses capacity as to stimulation as to suppression of immune response. The data obtained suggest basis for choice of method of isolation of pectins with specified immunomodulatory effect. Manipulation of composition of pectic fragments in the human gastrointestinal tract is supposed as a new approach of immunomodulatory therapy.

ПОВЫШЕННАЯ ВСТРЕЧАЕМОСТЬ ВИДОВ, ПРИМЕНЯВШИХСЯ ПРИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ, В НЕКОТОРЫХ СЕМЕЙСТВАХ РАСТЕНИЙ

Попов П.Л.

Институт географии им В.Б. Сочавы СО РАН, Иркутск, Россия
e-mail: plp@irigs.irk.ru

Эффективность химиотерапии вирусных инфекций пока сдерживается трудностью преодоления физиологических барьеров, мешающих инактивации вируса в организме человека или животного. Ожидается прогресс в этой проблематике, связанный с применением нанотехнологий. В связи с этим актуальна систематизация опыта традиционной медицины по применению растений при вирусных инфекциях и систематизация знаний о веществах, обусловливающих противовирусную активность растений. Нами составлен, по 8-ми томам источника [1] список 674 видов цветковых растений, применявшихся в традиционной медицине при 21 вирусной инфекции человека и животных [2]. Распределение этих видов в филогенетической системе [3] обнаруживает выраженные элементы упорядоченности [2]. Отмечается достоверно повышенная, либо достоверно сниженная доля применений при определенной инфекции, либо при вирусных инфекциях в целом в некоторых таксонах разных уровней. Приведем данные по уровню семейства. Связи «болезнь – семейство растений» оценивались с помощью критерия достоверности различия процентных долей по Фишеру. Поясним эти вычисления на примере бешенства и семейства горечавковых. В использованном источнике есть информация по 2715 видам растений, имеющих лекарственные применения. Из них к семейству горечавковых относятся 38 видов. Против бешенства применялось 6 видов семейства горечавковых (15,8%), и 92 вида остальной флоры лекарственных растений (не принадлежащих к этому семейству) (3,4%). Критерий Фишера позволяет оценить достоверность различия процентных долей. В данном случае величина этого критерия F=7,3. Гипотеза о случайном различии процентных долей при значении F от 3,8 до 6,6 отвергается с вероятностью 0,95, при значении 6,6 и выше отвергается с вероятностью 0,99. В традиционной медицине растения применялись и для профилактики и для лечения бешенства. Преимущественно говорится о применении растений против бешенства людей, иногда – животных. Мы объединили в применении «против бешенства», все варианты. Указание на лечение бешенства способно вызывать сомнение, потому что эта болезнь считалась смертельной во всех случаях. Но современной медицине по крайней мере один строго доказанный случай выздоровления человека от бешенства, при использовании нового метода лечения, известен [4]. Вероятно, случаи выздоровления бывали и в прошлом, и традиционная медицина пыталась использовать даже самые малые шансы. Указываем только крупные семейства, в которых достоверно повышена доля применений при 6 вирусных инфекциях, лидирующих (притом с немалым отрывом) по числу применявшихся против них видов растений, в скобках значение критерия Фишера. Лютиковые – корь (5,0), оспа (7,2); молочайные – бородавки (73,2), бешенство (10,3); зонтичные – ветряная оспа (5,2); жимолостные –бешенство (4,0); горечавковые – бешенство (7,3), желтухи (11,6); пасленовые – респир. инфекции (5,3), бешенство (9,3), желтухи (13,0); губоцветные – респир. инфекции (15,7); сложноцветные - желтухи (11,8). Принадлежность вида к семейству и более высокому таксону, обладающему высокой концентрацией применений при определенной вирусной инфекции может рассматриваться как критерий перспективности этого вида на обнаружение или дальнейшее изучение противовирусной активности. Лишь немногие из видов растений, приводимых в нашем списке, научно исследовались на противовирусную активность (по отношению к немногим вирусам); соединения, обусловившие эту активность (или ее часть), идентифицированы далеко не у всех исследованных видов. Тем не менее, имеющиеся данные позволяют сделать некоторые предположения относительно химической природы противовирусных соединений (в тех случаях, когда они еще не идентифицированы) указанной группы семейств. В справочнике [5] указывается 21 химическое соединение с антивирусным и виростатическим действием и виды растений, в которых эти соединения обнаружены. Далее, после названий семейств (берем только перечисленные выше семейства), в скобках указываем класс, к которому принадлежит антивирусное соединение (соединения) встречающееся в некоторых видах этого семейства, и число таких соединений, в соответствующей группе видов. Сложноцветные (флавоноиды -4 соединения, терпеноиды -1, танниды-1), зонтичные (флавоноиды-4, танниды-1), горечавковые (ксантоны - 1), лютиковые (флавоноиды-3, гамма-лактоны-1), жимолостные (флавоноиды -1, танниды-1), молочайные (флавоноиды-2, танниды-1), губоцветные (флавоноиды-4, танниды-1), пасленовые (флавоноиды-2, танниды-1). Таким образом, имеющиеся данные позволяют считать, что в данной группе семейств противовирусная активность преимущественно обусловливается флавоноидами. Но представляется очевидной и недостаточность этих данных, актуальность дальнейших экспериментальных исследований противовирусной активности растений.

Литература:

1. Растительные ресурсы СССР .Гл. ред. П.Д. Соколов. - Л. (С.Пб):т.т. 1-8, «Наука», 1984-1994.
2. *Попов П.Л.* Виды растений, применявшиеся при вирусных болезнях человека и животных: закономерности распределения в филогенетической классификационной системе//Журнал стрессовой физиологии и биохимии (электронный), 2008, т.4, № 3, стр.17-64
3. *Тахтаджян А.Л.* Система магнолиофитов. Ленинград, «Наука»,1987, 440 с
4. *Willoughby R.E.et. al.* Survival after Treatment of Rabies with induction of Coma//The New England journal of Medicine. June 16, 2005.
5. *Головкин Б.Н. и др.* Биологически активные вещества растительного происхождения, М., «Наука», 2001, тт.1-3.

THE RAISED OCCURRENCE OF THE KINDS APPLIED AT VIRUS INFECTIONS OF THE MAN AND ANIMALS IN SOME FAMILIES OF PLANTS

Popov P.L.

Sochava Institute of geography of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Irkutsk, Russia
e-mail: plp@irigs.irk.ru

Efficiency of chemotherapy of virus infections while restrains difficulty of overcoming of the physiological barriers stirring inactivation of a virus in a human body or an animal. Progress in this problematics, connected with application nanotechnologies is expected. In this connection ordering of experience of traditional medicine on application of plants is actual at virus infections and ordering of knowledge of the substances causing anti-virus activity of plants. By us it is made, on 8 volumes of a source [1] list of 674 kinds of the floral plants applied in traditional medicine at 21 virus infections of the person and animals [2]. Distribution of these kinds in phylogenetic system [3] finds out the expressed elements of orderliness [2]. Authentically lowered share of applications is marked authentically raised, or at a certain infection, or at virus infections as a whole in some таксонах different levels. We will cite data on family level. Communications «illness - family of plants» were estimated by means of criterion of reliability of distinction of percentage shares on Fisher. We will explain these calculations on a furiousness and family example горечавковых. In the used source there is an information by 2715 kinds of the plants having medicinal applications. From them 38 kinds concern family горечавковых. Against furiousness 6 kinds of family горечавковых (15,8 %), and 92 kinds of other flora of herbs (not belonging to this family) (3,4 %) were applied. Fisher's criterion allows to estimate reliability of distinction of percentage shares. In this case size of this criterion F=7,3. The hypothesis about casual distinction of percentage shares at value F from 3,8 to 6,6 is rejected with probability 0,95, at 6,6 and is above rejected with probability 0,99. In traditional medicine of a plant were applied both to preventive maintenance and for rabies treatment. It is mainly spoken about application of plants against rabies of people, sometimes - animals. We have united in application «against rabies», all variants. The instructions on furiousness treatment are capable to raise the doubts because this illness was considered deadly in all cases. But modern medicine at least one strictly proved case of recover of the person from furiousness, at use of a new method of treatment, is known [4]. Possibly, cases of recover happened and in the past, and the traditional medicine tried to use even the smallest chances. We specify only large families, in which the share of applications is authentically raised at 6 virus infections which are in the lead (besides with a considerable separation) on number of kinds of plants applied against them, in brackets value of criterion of Fisher. Ranunculaceae - a measles (5,0), a smallpox (7,2); Euphorbiaceae - warts (73,2), rabies (10,3); Umbellaceae - a chicken pox (5,2); Capripholiaceae-rabies (4,0); Gentianaceae - rabies (7,3), jaundices (11,6); Solanaceae - respir. Infections (5,3), rabies (9,3), jaundices (13,0); Lamiaceae - respir. Infections (15,7); Asteraceae - jaundices (11,8). The kind accessory to family and higher таксону, possessing high concentration of applications at a certain virus infection can be considered as criterion of perspectivity of this kind on detection or the further studying antivirus activity. Only few of kinds of the plants resulted in our list, scientifically were investigated on antivirus activity (in relation to few viruses); the connections which have caused this activity (or its part), are identified far not at all investigated kinds. Nevertheless, available data allow to make some assumptions concerning the chemical nature anti-virus compounds (when they are not identified yet) specified group of families. In the directory [5] 21 chemical compound with anti-virus and virostatic action and kinds of plants in which these connections are found out is underlined. Further, after names of families (we take only listed above family), in brackets we specify a class to which anti-virus compound (compounds) meeting in some kinds of this family belongs, and number of such connections, in corresponding group of kinds. Asteraceae (Flavonoids -4 compounds, Terpenoids-1, tannids-1), Apiaceae (Flavonoids -4, Tannids-1), Gentianaceae (Xanthones-1), Ranunculaceae (Flavonoids-3, Lactons-1), Capripholiaceae (Flavonoids-1, Tannids-1), Euphorbiaceae (Flavonoids-2, Tannids-1), Lamiaceae (Flavonoids-4, Tannids-1), Solanaceae (Flavonoids-2, Tannids-1). Thus, available data allow to consider, that in the given group of families antiviral activity mainly is caused with Flavonoids. But it is represented obvious and insufficiency of these data, an urgency of the further experimental researches to antiviral activity of plants.

References:

1. Растительные ресурсы СССР. т.т.1-8. Гл. ред. П.Д. Соколов. - Л. (С.Пб): Наука, 1984-1994.
2. *Попов П.Л.* Виды растений, применявшиеся при вирусных болезнях человека и животных: закономерности распределения в филогенетической классификационной системе//Журнал стрессовой физиологии и биохимии (электронный), 2008, т.4, № 3, стр.17-64
3. *Тахтаджян А.Л.* Система магнолиофитов. Ленинград, «Наука»,1987, 440 с
4. *Willoughby R.E.,et al.* Survival after Treatment of Rabies with induction of Coma//The New England journal of Medicine. June 16, 2005
5. *Головкин Б.Н. и др.* Биологически активные вещества растительного происхождения, М., Наука, 2001, т.1-3.

ГЕМОРЕОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГИБРИДНОГО МАКРОМОЛЕКУЛЯРНОГО АНТИОКСИДАНТА НА ОСНОВЕ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

Попова Е.В., Алиев О.И., [1]Домнина Н.С., [1]Сергеева О.Ю., Плотников М.Б.

Научно-исследовательский институт фармакологии СО РАМН, Томск, Россия
E-mail: mbp2001@ mail.ru
[1]Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

Целью настоящей работы явилось изучение влияния гибридного макромолекулярного соединения на вязкость крови в условиях модели гипервязкости крови *ex vivo.* Объект исследования – гибридный макромолекулярный антиоксидант (3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропионовая кислота) на основе полиэтиленгликоля с молекулярной массой 20 кДа (ПЭГ-КФ). Эксперименты проведены на крысах-самцах Вистар. ПЭГ-КФ вводили внутривенно однократно в дозе 10 мг/кг (n=5). Контрольные животные получали эквиобъемное количество 0,9% физиологического раствора (n=8), полиэтиленгликоля (20 кДа) (ПЭГ) (n=5) или пентоксифиллина (100 мг/кг) (n=5). Кровь для исследования забирали из общей сонной артерии под эфирным наркозом через 15 мин после введения исследуемых веществ. В качестве стабилизатора использовали 3,8% раствор цитрата натрия в соотношении с кровью 1:9. Вязкость крови регистрировали на ротационном вискозиметре АКР-2 в диапазоне скоростей сдвига от 3 $с^{-1}$ до 300 $с^{-1}$ до инкубации и через 60 мин после инкубации проб крови при температуре 20,0±0,4 ^{o}С (модель гипервязкости крови).

При инкубации проб крови контрольных групп животных (0,9% физиологический раствор) в течение 60 мин происходило достоверное повышению вязкости крови при скоростях сдвига от 3 $с^{-1}$ до 300 $с^{-1}$ на 7–20% относительно исходных значений. Введение ПЭГ также приводило к достоверному повышению вязкости крови при всех скоростях сдвига, при этом вязкость крови статистически значимо не отличалась от значений в группе животных, получавших физиологический раствор. Внутривенное введение пентоксифиллина препятствовало возрастанию вязкости крови при скоростях сдвига 10 $с^{-1}$, 50 $с^{-1}$ и 300 $с^{-1}$ на 10%, 8% и 6% соответственно относительно контроля (0,9% физиологического раствора). Введение ПЭГ-КФ способствовало снижению исследуемого показателя при скоростях сдвига от 5 $с^{-1}$ до 300 $с^{-1}$ на 7–11% по сравнению с контролем (ПЭГ).

Таким образом, внутривенное введение ПЭГ-КФ ограничивают повышение вязкости крови на модели гипервязкости крови *ex vivo.*

HEMORHEOLOGICAL ACTIVITY OF HYBRID MACROMOLECULAR ANTIOXIDANT ON THE BASIS OF POLYETHYLENE GLYCOL

Popova E.V., Aliev O.I., [1]Domnina N.S., [1]Sergeeva O.Y., Plotnikov M.B.

Research Institution of Pharmacology, Scientific Center of Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, Russia
e-mail: mbp2001@ mail.ru
[1]St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

The aim of the present work was to evaluate effects of the hybrid macromolecular compound on whole blood viscosity using the model of blood hyperviscosity *ex vivo*. The object of this study was hybrid macromolecular antioxidant (3-(3,5-d-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionic acid on the basis of polyethylene glycol with molecular weight of 20 kDa (PEG-PP). Experiments were carried in male Wistar rats. Rats were given a single intravenous dose of PEG-PP (10 mg/kg) (n=5). Control rats received equivolume injections of 0.9% saline (n=8), polyethylene glycol (PEG) (20 kDa) (n=5) or pentoxifylline (100 mg/kg) (n=5). Blood samples for this study were taken from common carotid artery under ether anaesthesia 15 minutes after injection of the test substances. The blood was stabilized by 3.8% solution of sodium citrate in the ratio 1:9. The viscosity of whole blood was registered by the rotary viscometer AKR-2 at shear rates 3–300 s^{-1} before incubation and 60 minutes after incubation at 20.0±0.4 ^{o}C (the model of blood hyperviscosity).

Significant increase of blood viscosity was received after incubation two control group samples (0.9% saline and PEG). Intravenous administration of pentoxifylline inhibited the increase of whole blood viscosity by 10%, 8%, and 6% at shear rate 10 s^{-1}, 50 s^{-1}, and 300 s^{-1}, respectively, relative to control (0.9% saline). Injection of PEG-PP contributed to the reduction in whole blood viscosity by 7–11% at shear rates 5–300 s^{-1} (compared to control PEG-group).

Thus, intravenous administration of PEG-PP manages the reduction in whole blood viscosity in the model of blood hyperviscosity *ex vivo*.

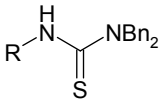
СЕЛЕНОМОЧЕВИНЫ – НОВЫЙ КЛАСС АНТИОКСИДАНТОВ

Прошин А.Н., Серков И.В., Дубова Л.Г., Шевцова Е.Ф.

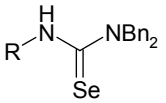
Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Московская обл., Россия,
e-mail: proshin@ipac.ac.ru

В последнее время химия селеноорганических соединений является одним из бурно развивающихся направлений элементорганической химии. Исследованиями последних лет было показано, что селен является важным компонентом в функционировании многих биологических систем. Низкая концентрация селена в плазме является фактором риска при различных патологических процессах: рак, сердечно-сосудистые заболевания, остеоартрит. Особое значение селен имеет для функционирования мозга. Снижение содержания этого элемента наблюдается как при старении, так и при целом ряде нейродегенеративных заболеваний, одновременно со значительным ростом окислительных повреждений липидов и белков. В этой связи направленный синтез селеноорганических соединений с антиоксидантным потенциалом представляет значительный интерес для создания потенциальных нейропротекторов.

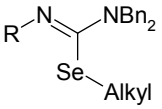
Нами синтезированы селено- и изоселеномочевины и изучена их антиоксидантная активность. Селеномочевины **2** получали реакцией с вторичными аминами изоселеноцианатов, которые синтезировали из соответствующих формамидов, фосгена и селена (порошок). Последующее алкилирование селеномочевин по атому селена приводило к ациклическим производным изоселеномочевины **3** (1).



1



2



3

Изучение антиоксидантной активности синтезированных селенсодержащих соединений проводили по их влиянию на перекисное окисление липидов (ПОЛ) в гомогенатах мозга крыс. Показано, что изоселеномочевины **3** подавляют ПОЛ в гомогенатах мозга крыс с IC_{50} от 15 до 50 мкМ. Селеномочевина **2** является более эффективным антиоксидантом с IC_{50} = 1,1±1,7 мкМ, что сравнимо со значением этого показателя для Тролокса. Обнаруженная нами антиоксидантная активность селеномочевин, по-видимому, связана именно с атомом селена. Так, их серные биоизостеры - тиомочевины **1**, практически не обладают антиоксидантной активностью (IC_{25} = 0,1 мМ).

Работа выполнена при финансовой поддержке госконтракта по ФЦП № 14.740.11.0810, гранта по Программе Президиума РАН № 7, гранта РФФИ № 11-03-00863-а.

Литература:

1.А.Н. Прошин, И.В. Серков, С.О. Бачурин. Синтез тетразамещенных изоселеномочевин. Доклады Академии Наук, Химия, 2010, Т. 430, № 2, С. 58-60.

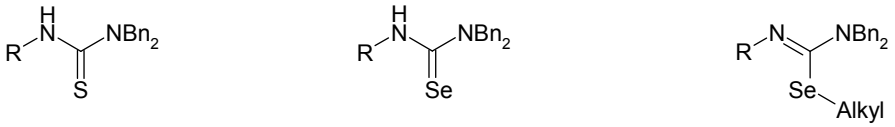
THE SELENOUREAS – POTENTIAL NEUROPROTECTORS WITH THE ANTIOXIDANT ACTIVITY

Proshin A.N., Serkov I.V., Dubova L.G., Shevtsovs E.F.

Institute of Physiologically Active Compounds RAS, Chernogolovka, Russia
e-mail: proshin@ipac.ac.ru

Recently the chemistry of Se-containing compounds is one of roughly developing directions of organic chemistry. The researches of last years shown selenium are the important component in functioning many biological systems. Low concentration of selenium in plasma is a risk factor at various pathological processes: a cancer, cardiovascular diseases and other. Special importance has selenium for functioning of the brain. The decrease of this element is observed both at ageing, and at a lot of neurodegeneration diseases, simultaneously with significant increase of oxidative impairments of lipids and proteins. In this connection the directed synthesis of organic selenium compounds with antioxidant properties represents significant interest for the creation of potential neuroprotectors.

We are synthesized seleno- and isoselenoureas and are investigated their antioxidant properties. Selenoureas **2** have been received by the reaction of the secondary amines with isoselenocyanates synthesized from corresponding formamides, phosgene and selenium (powder). The following Se-alkylation of selenoureas led to the acyclic derivatives of the isoselenourea **3** (1).



1 **2** **3**

The antioxidant activity of new synthesized compounds has been estimated as influence on in vitro lipid peroxidation (LP) of rat brain homogenates (RBH). It was shown, that isoselenoureas 3 significantly decrease the LP of RBH with the IC_{50} from 15 up to 50 mkM. Selenourea 2 is the effective antioxidant with IC_{50} = 1,1±1,7 mkM similar to standart antioxidant Trolox. We suggest, that antioxidant activity of these new compounds tightly connected with selen: the bioisosteric thiourea (1) analog of selenourea 2 practically have no antioxidant activity at the same concentrations (IC_{50} > 0,1mM).

The investigation was supported by the State contract № 14.740.11.0810, the grant of the RFBR № 11-03-00863-a.

References:

1.*A.N. Proshin, I.V. Serkov, S.O. Bachurin.* Synthesis of Tetrasubstituted Isoselenoureas. Doklady Chemistry, 2010, V. 430, Part 2, pp. 8–10.

ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОЇ РЕЧОВИНИ «ГРІНІЗАЦІЯ ГРІН R» НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ ЗА УМОВ ЗЛОЯКІСНОГО РОСТУ

Раєцька Я.Б., Булавка А.В., Строцька Є.А., Преображенська Т.Д., Остапченко Л.І.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, «Інститут біології».
e-mail: raetska@yandex.ru

На сьогоднішній день експериментальними і клінічними спостереженнями переконливо доведена перспективність використання засобів природного походження в комбінованій терапії онкологічних захворювань. Дуже часто основною причиною терапевтичних невдач у лікуванні хворих на рак є формування резистентності пухлин до різних хіміопрепаратів. Тому особливий інтерес викликають препарати, що підвищують протипухлинну резистентність, що перешкоджають розвитку метастазів і рецидивів пухлин, що знижують токсичні прояви хіміотерапії. Крім класичної фітотерапії, нині у світі широко застосовуються харчові добавки (БАД), як в комплексному лікуванні так і для профілактики захворювань. Одним з таких препаратів є «Грінізація Грін R» - розроблений в Україні, представляє собою порошкову форму очищених білкових фракцій *голотурії далекосхідної* і вермікультури, зроблених по спеціальній технології (неферментативній, багатоступінчатій, низькотемпературній), що дозволяє уникнути денатурації білків, збільшити їх біодоступність, зберегти глобулярний стан з повним збереженням регуляторних пептидів ядерних ДНК та їх функціональних якостей.

Досліди проводились на 100 білих лабораторних щурах-самках масою 150±10 г, яких утримували на стандартній дієті віварію. Тваринам трансплантували резистентну карциному Герена шляхом підшкірної ін'єкції у ділянку стегна задньої кінцівки 20%-ної суспензії пухлинних клітин на 0,9%-ному розчині NaCl, отриманих від щурах-донора (штам пухлини наданий Інститутом експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Кавецького НАН України). Частині тварин щоденно протягом 21-ї доби після прищеплення пухлини вводили дослідний препарат в різних дозах. Тварин декапітували через 10, 15 та 21 добу після прищеплення пухлини.

Метою нашої роботи було дослідження показників пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) і ферментів антиоксидантної системи (АОС) в органах (головному мозку, печінці та селезінці) тканині щурів з резистентною карциномою Герена у динаміці її росту за умов введення препарату «Грінізація Грін R» в різних дозах.

Проведено дослідження інтенсивності вільнорадикального окиснення ліпідів та активності антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази і каталази - у тканинах печінки, селезінки та мозку щурів з резистентною формою карциноми Герена за дії препарату «Грінізація ГРІН R» у дозах 90 та 136 мг/кг. На підставі проведених досліджень встановлено, що злоякісний ріст призводить до змін значень пероксидного окислення ліпідів. Порушення інтенсивності ПОЛ в результаті злоякісного росту супроводжувалося змінами активності ферментів антиоксидантної системи. Показано, що введення лікувального препарату із властивостями антиоксидантів сприяє нормалізації процесів пероксидації завдяки включенню адаптивно-компенсаторних механізмів. Нами було показано, що дослідний препарат «Грінізація Грін R» проявляє значний гальмівний ефект на ріст резистентної пухлини. Отже, можна зробити висновок, за умов введення досліджуваного препарату «Грінізація Грін R» в різних дозах прослідковувалася спільна тенденція, однак, за умов введення більшої дози препарату, вплив був ефективнішим. На цій підставі антиоксидантні препарати можуть бути запропоновані з метою профілактики та комплексного лікування злоякісних новоутворень.

INFLUENCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF "GREENEZATION GREEN R" ON THE ACTIVITY OF ENZYMES OF ANTIOXIDANT SYSTEM IN CONDITION OF MALIGNANT GROWTH

Raetska Ya.B., Strotska E.A., Preobrazhenska T.D., Ostapchenko L.I.

Institute of Biology, Taras Shevchenko National University of Kyiv
e-mail: raetska@yandex.ru

Nowadays, the experimental and clinical observations convincingly provide perspectives of use of compounds of natural origin during the combined treatment therapy of cancer. Very often, the main cause of therapeutic failure in treating cancer patients is resistance of tumors to different chemotherapeutic drugs. Therefore, it is of special interest such drugs that enhance antitumor resistance that hinder the development of metastasis and recurrence of cancer as well as reducing toxic manifestations of chemotherapy. Beside the classical herbal medicine, it is now widely used biologically food additives (BFA) as in treatment and prophylaxis of diseases. One of these products is «Greenization Green R» which is developed in Ukraine in a powder form of purified protein fractions of *far east Holothuroidea* and *Vermiculture*, made by special technology (nonenzymetic, multistage, low temperature) which allows to avoid the denaturation of proteins, increases their bioavailability, saves the globular state of nuclear DNA regulatory peptides and their functional qualities.

Experiments were conducted on 100 white-female laboratory rats weighing 150 ± 10 g, which were kept on a standard diet in standard animal facility. Animals were transplanted with resistant form of Guerin carcinoma by subcutaneous injection in the thigh area of the limb 20% suspension of tumor cells based on 0,9% NaCl solution, obtained from donor rats (strain of the tumor provided by the Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology. R. Ukraine combined treatment). Some of the animals received treatment for 21 day after grafting tumors by injecting studied drug in various doses. The animals were decapitated on 10, 15 and 21 days after tumor grafting.

The aim of our work was to study the parameters of lipid peroxidation (LPO) and enzymes of antioxidant systems (EAS) in the organs (brain, liver and spleen) tissues of rats with resistant Guerin carcinoma in the dynamics of its growth under conditions of a drug "Grinization Green R» in different doses.

Study was focused on the intensity of free radical oxidation of lipids and activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in the tissues of liver, spleen and brain of rats with resistant form of Guerin carcinoma with application of the " Grinization GREEN R» in doses of 90 and 136 mg / kg. On the basis of study it was revealed that malignant growth leads to changes in the lipid peroxidation (LPO). Disturbance of the intensity of LPO as a result of malignant growth was accompanied by changes of antioxidant enzyme system. It was shown that introduction of therapeutic drug with antioxidant properties helped to normalize peroxidation processes via stidmulation of adaptive-compensatory mechanisms. We have shown that drug "Grinization Green R» shows a significant inhibitory effect on the growth of resistant tumors. We can conclude that during studied conditions, application of different doses of "Grinization Green R» shows a common trend, however, more effect were seen with application of high doses. On the basis of this study, antioxidant drugs can be offered as the prevention and complex treatment of malignant neoplasms.

ВЛИЯНИЕ СИСТЕМНОГО ВВЕДЕНИЯ ГАММА-ОКСИМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ СИЛЫ МЫШЦ ЗАДНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ У КРЫС ПОСЛЕ ТРАВМЫ

Родинский А. Г., Демченко Т.В.

Днепропетровская государственная медицинская академия, Днепропетровск, Украина
e-mail; tatiana_mashko@mail.ru

В настоящее время известна нейромодулирующая функция гамма-оксимасляной кислоты (ГОМК) в ЦНС, ее влияние на работу дофаминергической, ГАМК-ергической и катехоламинергической систем, на реализацию моно- и полисинаптических рефлексов, а также ее антигипоксический эффект в скелетных мышцах. Нами было изучено влияние системного введения ГОМК (100 мг/кг в/б, ежедневно в течение 4-х недель после денервации) на восстановление силы мышц-сгибателей и разгибателей задних конечностей после передавливания правого седалищного нерва у крыс. Анализировали такие показатели как: функциональный седалищный индекс (ФСИ) и динамику восстановления силы сокращения мышц-сгибателей пальцев и разгибателей стопы в ранние (с 1-й по 4-ю недели), и поздние (на 10-ю и 12-ю недели) сроки после операции.

В экспериментальной группе на стороне передавливания нерва скорость восстановления функциональной активности под влиянием ГОМК зависела от типа мышц. Так, восстановление функциональной активности седалищного нерва по показателю ФСИ и силы мышц-разгибателей правой стопы в экспериментальной группе происходило уже к 4-й неделе, тогда как в контрольной группе – лишь к 12-й неделе. Полное восстановление силы мышц-сгибателей правой стопы (по-сравнению с показателями до операции) происходило в экспериментальной группе к 3-й неделе, тогда как в контрольной группе – лишь к 10-й неделе. В отдаленные сроки (10-я и 12-я недели) после операции анаболический эффект ГОМК в виде увеличения силы мышц в большей степени проявлялся для мышц-разгибателей правой стопы (на 40% и 30% соответственно по-сравнению с контролем), чем для мышц – сгибателей (где сила возросла всего лишь на 5% и 4% соответственно по-сравнению с контролем).

Для контралатеральной конечности системное введение ГОМК сопровождалось существенным (особенно, с 3-й недели) увеличением силы сокращений, как мышц-разгибателей, так и мышц-сгибателей пальцев по-сравнению с контрольной группой. В последующие сроки сила этих мышц в экспериментальной группе была на 20-40% выше, чем сила мышц контралатеральной конечности контрольной группы. На поздних сроках регенерации (10-я и 12-я недели) это увеличение силы под действием ГОМК на контралатеральной стороне было не только выше, чем в контрольной группе, но и больше исходной величины до операции. Таким образом, эффект ГОМК для контралатеральной конечности проявился в виде прироста силы и составил для мышц-разгибателей - 26% (10-я неделя) и 20% (12-я неделя), а для мышц-сгибателей соответственно - 48% и 36%. Вероятно, увеличение и прирост силы нельзя объяснить преимущественно метаболическим влиянием ГОМК в мышцах. Поскольку известно, что ГОМК может воспроизводить эффекты ГАМК, действуя в качестве нейротрансмиттера или нейромодулятора, то можно предположить два возможных механизма положительного влияния ГОМК на процессы восстановления. Первый - способность ГАМК к новому, противоположному тормозному влиянию, эффекту – деполяризации нейронов за счет длительного увеличения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в поврежденных нейронах, т.е. участие ГАМК в процессах восстановления после травмы. Вторым механизмом является тот факт, что на ранних этапах развития ЦНС, ГАМК может действовать как несинаптический трофический фактор, способствуя дифференцировке нейронов, увеличению длины дендритов, разветвлению и повышению плотности синапсов. Предполагается, что ГОМК может ускорять рост отростков нервных клеток, ответственных за проведение нервных импульсов, а это, в свою очередь, может ускорить рост и регенерацию поврежденных нервов.

THE INFLUENCE OF SYSTEMIC INJECTION OF GAMMA-HYDROXYBUTYRATE ON MUSCLE FORCE RESTORATION IN RATS HIND LIMBS AFTER THE TRAUMA

Rodinsky A.G., Demchenko T.V.

The Dnepropetrovsk state medical academy, Dnepropetrovsk, Ukraine
e-mail; tatiana_mashko@mail.ru

Nowadays the neuromodulatory function of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in CNS, its influence on work of dopaminergic, GABA-ergic and catecholaminergic systems, on realization of mono- and polysynaptic reflexes and also antihypoxic action in skeletal muscles are known. We have studied the influence of systemic injection of GHB (100 mg/kg, IP, daily within 4 weeks after denervation) on restoration of the muscle force of the flexor and extensor muscles of the rats' hind limbs after right sciatic nerve was compressed.

For analysis we used such indicators as: the sciatic functional index (SFI), the strength of the extensor muscles of the foot and flexors of the toes in early (from the 1st till 4th weeks) and late (on 10th and 12th weeks) postoperative periods.

It has been established that in experimental group on the clipped side the rate of functional activity under the influence of GHB was depended on muscles type. So, restoration of functional activity of a sciatic nerve (for SFI) and strength of extensor muscles of the right foot in experimental group descended by 4th week, whereas in control group - only by 12th week. The complete recovery of toes flexors of the right side (on-comparison before operation) descended in experimental group by 3rd week, whereas in control group - only by 10th week. In the late postoperative period the anabolic effect of GHB in the form of increasing of muscles force was resided in a greater degree for extensor muscles of the right side (on 40 % and 30 % accordingly in comparison with control), than for the flexor muscles (where force has increased only on 5 % and 4 % accordingly in comparison with control).

We found that for the contralateral limb the introduction of GHB was accompanied essential (especially, from 3rd week) augmentation of muscle force both extensor and flexor muscles in comparison with control group. In the subsequent terms the force of these muscles in experimental group was on 20-40 % more, than force of these muscles in control group. In late postoperative period of regeneration this augmentation of muscle force under the influence of GHB on the contralateral side was more than in control group and more than initial force before operation in this group. Thus, effect of GHB on contralateral limb was displayed in the form of strength gain and has compounded for extensor muscles - 26 % (10th week) and 20 % (12th week), and for flexors accordingly - 48 % and 36 %. This strength gain is impossible to explain mainly by metabolic influence of GHB in muscles.

Because is known that GHB can replicate effects of GABA, reacting in quality of neurotransmitter or neuromodulator it is possible to assume two mechanisms of positive influence of GHB on restoration process. The first - ability of GABA to new, inverse brake influence, effect - neutron depolarization at the expense of prolonged increase of intracellular Ca^{2+} concentration in damaged neurons, i.e. participation of GABA in processes of restoration after a trauma. The second mechanism is that fact that at early stages of CNS development, GABA can react as nonsynaptic trophic factor, promoting a differentiation of neurons, augmentation of dendrites length, influence on branching and increasing synapses density. It is supposed that GHB can accelerate growth of neuronal processes which are responsible for nerve impulses transmission, and it, in turn, can accelerate growth and regeneration of damaged nerves.

НОВЫЕ ФОСФОРФТОРСОДЕРЖАЩИЕ СЕЛЕКТИВНЫЕ ИНГИБИТОРЫ КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗЫ ПЛАЗМЫ МЫШЕЙ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ *IN VIVO*

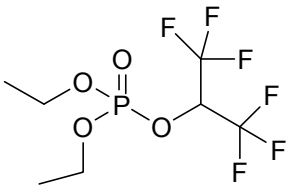
Рудакова Е.В., Галенко Т.Г., Махаева Г.Ф.

Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Россия
e-mail: rudakova@ipac.ac.ru

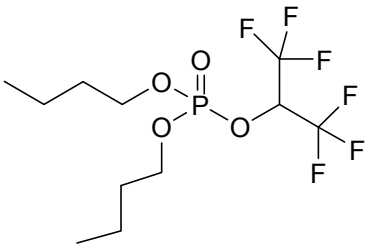
Карбоксилэстеразы (КЭ, КФ 3.1.1.1) ответственны за метаболизм целого ряда различных лекарственных средств, содержащих сложноэфирные или амидные группировки. В связи с этим использование селективных ингибиторов данного фермента важно для модуляции эффективности таких препаратов. Кроме того, предклинические исследования потенциальных лекарственных средств проводятся на грызунах, которые, в отличие от человека, имеют высокий уровень КЭ плазмы и быстро гидролизуют соединения, содержащие сложноэфирную или амидную группировку. В связи с этим возникает задача создания адекватной модели на мышах для исследования фармакологически важных соединений. Такая модель может быть создана при использовании селективных ингибиторов КЭ, обладающих низкой острой токсичностью.

Ранее нами было показано, что фосфорилированные 1-гидроперфторизопропанолы (PFP) общей формулы $(RO)_2P(O)OCH(CF_3)_2$, где R = Alkyl, в опытах *in vitro* проявляют избирательность в отношении КЭ по сравнению с ацетилхолинэстеразой (АХЭ, КФ 3.1.1.7) и бутирилхолинэстеразой (БХЭ, КФ 3.1.1.8) [1-2].

Целью данной работы является исследование ингибиторной активности двух соединений diEt-PFP (R=Et) и diBu-PFP (R=*n*-Bu) в отношении АХЭ, БХЭ и КЭ крови мышей при однократном в/бр введении.



diEt-PFP



diBu-PFP

Соединения растворяли в ДМСО и вводили в/бр белым беспородным мышам (25-30 г) в объеме около 0,1 мл. Контрольные животные получали только ДМСО. Через 1 час после введения мышей декапитировали в условиях CO_2 - анестезии и немедленно собирали кровь в гепаринизированные стеклянные флаконы. Активности эстераз определяли в цельной крови. АХЭ и БХЭ определяли методом Эллмана, субстраты – ацетилтиохолин (в присутствии этопропазина) и бутирилтиохолин, соответственно (25ºС, 0.1 М фосфатный буфер, pH 7.5, λ 436 нм). Активность КЭ определяли спектрофотометрически, субстрат – 1-нафтилацетат (25ºС, 0.1 М фосфатный буфер, pH 8.0, λ 322 нм).

Установлено, что diEt-PFP и diBu-PFP эффективно ингибируют КЭ (EC_{50}=25.0±1.0 и 3.08±0.27 мг/кг, соответственно), менее эффективно ингибируют БХЭ (EC_{50}=46.8±1.5 и 15.7±1.8 мг/кг, соответственно) и не ингибируют АХЭ. При этом соединения проявляют низкую острую токсичность (для diEt-PFP $ЛД_{50}$=200 мг/кг, для diBu-PFP $ЛД_{50}$>2500 мг/кг, в/бр), что позволяет использовать их, особенно diBu-PFP, в качестве новых высокоэффективных ингибиторов КЭ плазмы *in vivo* при исследовании в опытах на мышах фармакологически важных препаратов, содержащих сложноэфирные или амидные группы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы РАН ОХНМ 9 «Биомолекулярная и медицинская химия» и гранта РФФИ (проект №11-03-00581-а).

Литература

1. *Г.Ф. Махаева, О.Г. Серебрякова, Н.П. Болтнева, Т.Г. Галенко, А.Ю. Аксиненко, В.Б. Соколов, И.В. Мартынов.* // Эстеразный профиль и анализ связи структура-ингибиторная селективность гомологичных фосфорилированных 1-гидроперфторизопропанолов - ДАН, 2008, т. 423, N6, с. 826-831
2. *G.F. Makhaeva, A.Y. Aksinenko, V.B. Sokolov, O.G. Serebryakova, R.J. Richardson.* // Synthesis of organophosphates with fluorine-containing leaving groups as serine esterase inhibitors with potential for Alzheimer disease therapeutics - Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009, V.19, p. 5528-5530

NEW PHOSPHOROFLUORO-CONTAINING SELECTIVE INHIBITORS OF MICE PLASMA CARBOXYLESTERASE FOR *IN VIVO* APPLICATION

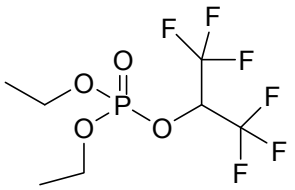
Rudakova E.V., Galenko T.G., Makhaeva G.F.

Institute of Physiologically Active Compounds Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russia
e-mail: rudakova@ipac.ac.ru

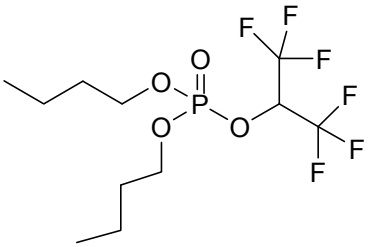
Carboxylesterases (EC 3.1.1.1, CaE) are responsible for the metabolism of a whole host of different therapeutically useful drugs that contain ester or amide bonds. Therefore, the use of selective inhibitors of these enzymes might be valuable in modulating the efficacy of such agents. In addition, preclinical studies are carried out commonly in rodent models. The CaE activity in rodent plasma was reported to be significantly higher than that in humans. So, the ester and amide-containing drugs undergo rapid degradation in rodent plasma. In this connection there is the task of creating an adequate model in mice for the study of pharmacologically important compounds. The application of selective CaE inhibitors possessing low acute toxicity in the experiments *in vivo* may represent a viable model.

Our previous *in vitro* studies showed that phosphorylated 1-hydroperfluoroisopropanoles (PFP) of general formula $(RO_2)P(O)OCH(CF_3)_2$, where R=Alkyl, exhibit the selectivity to the CaE in comparison with acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8).[1-2]

The aim of this study was to investigate the inhibitory activities of two compounds, diEt-PFP (R=Et) and diBu-PFP (R= *n*-Bu), against AChE, BChE and CaE in mice blood after a single i.p. injection.



diEt-PFP



diBu-PFP

The studied compounds were dissolved in DMSO and injected i.p. into outbred white mice (25–30g) in the volume about 0.1 ml. The control animals received only DMSO. In 1 h after administration the animals were decapitated under CO_2-anesthesia. Trunk blood from each animal was collected immediately in heparinized glass vials. The esterase activities were determined in whole blood. AChE and BChE were measured by the Ellman assay using acetylthiocholine (in the presence of ethopropazine) or butyrylthiocholine as a substrate (25°C, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5, λ 436 nm). CaE activity was determined spectrophotometrically using 1-naphtyl acetate as a substrate (25°C, 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0, λ 322 nm).

We found that diEt-PFP (R=Et) and diBu-PFP have the high inhibitory activities against mice CaE (EC_{50}=25.0±1.0 and 3.08±0.27 mg/kg, respectively), lower anti-BChE activities (EC_{50}=46.8±1.5 and 15.7±1.8 mg/kg, respectively) and no activity against AChE. These compounds were shown to have a low acute toxicity (diEt-PFP LD_{50}=200 mg/kg, diBu-PFP LD_{50} >2500 mg/kg, i.p.). Thereby, the studied compounds, especially diBu-PFP, can be used as the new highly efficient *in vivo* inhibitors of plasma CaE in the study of pharmacologically important drugs containing ester or amide groups in the experiments on mice.

Supported by Program of Russian Academy of Sciences "Biomolecular and Medicinal chemistry" and grant RFBR (project № 11-03-00581-a).

References:

1. *G.F. Makhaeva, O.G. Serebryakova, N.P. Boltneva, T.G. Galenko, A.Y. Aksinenko, V.B. Sokolov, I.V. Martynov.* // Esterase profile and analysis of structure-inhibitor selectivity relationships for homologous hosphorylated 1-hydroperfluoroisopropanols - Dokl. Biochem. Biophys., 2008, V.423, p. 352-357
2. *G.F. Makhaeva, A.Y. Aksinenko, V.B. Sokolov, O.G. Serebryakova, R.J. Richardson.* // Synthesis of organophosphates with fluorine-containing leaving groups as serine esterase inhibitors with potential for Alzheimer disease therapeutics - Bioorg. Med. Chem. Lett., 2009, V.19, p. 5528-5530

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЕ И ЖЕЛЧЕГОННЫЕ СВОЙСТВА НИКОТИНОИЛТРИТЕРПЕНОИДОВ НА МОДЕЛИ ГЕПАТИТА, ВЫЗВАННОГО CCL_4 У КРЫС

Сапожникова Т.А., Габдрахманова С.Ф., Макара Н.С., Хисамутдинова Р.Ю., Казакова О.Б., Медведева Н.И., Лопатина Т.В., Юнусов М.С.

Учреждение Российской академии наук Институт органической химии УНЦ РАН, Уфа, Россия
e-mail: newpharm@anrb.ru

Природные и синтетические тритерпеноиды имеют широкий спектр биологической активности. Их способность проявлять антиоксидантные, потивовоспалительные, противовирусные, а также мембраностабилизирующие свойства в сочетании с низкой токсичностью позволяют применять их для лечения больных с различной гепатобилиарной патологией [1, 2].

Целью нашей работы было выявление соединений ряда никотиноилтритерпеноидов, обладающих гепатопротекторной и желчегонной активностями на модели острого гепатита, вызванного CCl_4 у крыс.

Скрининг проводили на крысах на модели острого токсического гепатита вызванного CCl_4 [3]. В сыворотке крови крыс определяли уровни содержания маркерных ферментов: аланинамино- и аспартатаминотрансферазы (АЛТ и АСТ). Желчегонную активность определяли по [3]. Изучаемые соединения и Карсил вводили перорально в дозе 12 мг/кг [2].

Были изучены следующие соединения: олеаноловая кислота (1), никотинат олеаноловой кислоты (2), глицирретовая кислота (3), никотинат глицирретовой кислоты (4), бетулоновая кислота (5), диникотинат 20–кетобетулина (8), диникотинат бетулина (6) и его водорастворимые формы: диникотинат бетулина дигидрохлорид (7) и диникотинат бетулина дигидробромид (9).

Все изучаемые тритерпеноиды на 10 сутки уменьшали гепатотоксическое действие CCl_4, проявляя тенденцию к снижению уровней ферментов трансаминаз. Наибольшей активностью среди них обладали соединения **9**, **6**, **3** и **7**, которые понижали уровень АЛТ на 34.4%, 31.2%, 26.2%, и 14,8% (0,04±0,01, 0,037±0,004, 0,045±0,003 и 0,052±0,006 мккат/л, $p<0,05$ соответственно) и уровень АСТ - на 14,8%, а **7** на 24,1%, (0,046±0,002, 0,046±0,003, 0,046±0,003 и 0,041±0,004 мккат/л, $p<0,05$) соответственно по сравнению с контролем. Карсил снижал уровни АЛТ и АСТ лишь на 6,6% (0,057±0,004 мккат/л) и 4% (0,052±0,004 мккат/л) соответственно по сравнению с контролем (АЛТ - 0,061±0,005 и АСТ - 0,054±0,003 мккат/л). Соединения **2, 6, 7, 8** усиливали скорость секреции желчи в течение первого часа, по сравнению с контролем, интактной группой и карсилом. В группах, где животные получали соединения **2, 7, 8** скорость секреции желчи оставалась высокой также и в течение 2-го и 3-го часа. Общее количество желчи, выделившееся за 3 часа в группах **2, 6 - 9** было выше, на 105,6%, 65,7%, 49,2%, 79,4% и 48,8% (1241,2±43,8, 1000,0±47,2, 900,33±28,8, 1089,4±31,4, 898,2±83,3 мг/100 г, $p<0,05$) соответственно, по сравнению с контрольной группой (603,43±29,5 мг/100 г).

Анализ скрининга ряда никотиноилтритерпеноидов выявил для дальнейшего изучения. потенциальные гепатопротекторы, проявившие выраженные гепатопротекторные и желчегонные свойства: никотинат олеаноловой кислоты, диникотинат бетулина дигидрохлорид, диникотинат-20–кетобетулина, диникотинат бетулина дигидробромид активность которых была значительно выше чем, при применении карсила и тритерпеноидов не имеющих в своем составе никотиновую кислоту (олеаноловая кислота, глицирретовая кислота и бетулоновая кислота).

Литература:

1. *О. Б. Казакова, Н. И. Медведева, И. П. Байкова, и др.,* Биоорг. химия, **36**(6), 841-848 (2010)
2. *О.Б. Флехтер, Л.Т. Карачурина, Л.Р. Нигматуллина, и др.,* Биоорг. химия, **28**, 543-550 (2002).
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, Р.У. Хабриева (ред), Москва (2005).

HEPATOPROTECTIVE AND CHOLERETIC PROPERTIES OF NICOTINOILTRITERPENOIDS ON MODEL OF CCL_4-HEPATITIS ON RAT

Sapozhnikova T.A., Gabdrahmanova S.F., Makara N.S., Khisamutdinova R.J., Kazakova O.B., Medvedeva N.I., Lopatina T.V., Yunusov M.S.

Institute of Organic chemistry, Ufa Sientific Center, Russian Academy of Science, Ufa, Russia
e-mail: newpharm@anrb.ru

Natural and synthetic triterpenoid have a wide spectrum of biological activity. Its capacity to show antioxidant, anti-inflammatory, antiviral as well as membrane-stabilization properties in a combination to low toxicity allow to apply them to treatment of patients with various hepatobiliary pathology [1, 2].

The aim of our study was to appeare compound of a range of nicotinoiltriterpenoids, possessing hepatoprotective and choleretic activity on model of the sharp CCl4-hepatitis on rats.

Screening spent on rats on model of a sharp CCl4-hepatitis [3]. In rat blood serum defined levels of marked enzymes: alanin- and aspartat aminotransferase (ALT and AST). Choleretic activity defined on [3]. Studied compounds and Carsil were given per os in a dose of 12 mg/kg [2].

Following connections have been studied: oleanolic acid (1), nicotinoil oleanolic acid (2), glicyrrhetic acid (3), nicotinoil glicyrrhetic acid (4), betulonic acid (5), dinicotinoil-20–ketobetulin(8), dinicotinoil betulin (6) and it water-soluble forms: dinicotinoil betulin dihydrochloride (7) and dinicotinoil betulin dihydrobromide (9).

All studied triterpenoids for 10 day reduced hepatotoxic action of CCl4, tending to have to decrease in levels of serum transaminase. The greatest activity among them possess compounds **9**, **6**, **3** and **7** which reduced ALT level on 34,4%, 31,2%, 26,2%, and 14,8 % (0,04±0,01, 0,037±0,004, 0,045±0,003 and 0,052±0,006 μkat/l, $p<0,05$ respectively) and a AST level - on 14,8 %, and 7 on 24,1 %, (0,046±0,002, 0,046±0,003, 0,046±0,003 and 0,041±0,004, μkat/l, $p<0,05$) respectively in comparison with the control group. Carsil reduced ALT and AST levels only on 6,6% (0,057±0,004 μkat/l) and 4% (0,052±0,004 μkat/l) respectively in comparison with the control (ALT - 0,061±0,005 and AST - 0,054±0,003, μkat/l). Compounds **2**, **6**, **7**, **8** strengthened speed of bile secretion within the first hour, in comparison with the control, intact group and Carsil. In groups where animals received compounds **2, 7, 8** speed of bile secretion remained high as well within 2nd and 3rd hour. The total of bile allocated for 3 hours in groups 2, 6 - 9 was above, on 105,6 %, 65,7 %, 49,2 %, 79,4 % and 48,8 % (1241,2±43,8, 1000,0±47,2, 900,33±28,8, 1089,4±31,4, 898,2±83,3 mg/100 g, $p<0,05$) respectively, in comparison with control group (603,43±29,5 mg/100 g).

Analysis of the screening series nikotinoiltriterpenoids identified for further study of potential hepatoprotectors, which showed expressive hepatoprotective and choleretic properties: nicotinoil oleanolic acid, dinikotinoil betulin dihydrochloride dinikotinoil-20-ketobetulin, dinikotinoil betulin digidrobromid activity were significantly higher than in the application of Carsil and triterpenoids do not have in their composition nicotinic acid (oleanolic acid, glycyrrhetic acid and betulonic acid).

Referenses:

1. *O.B.Kazakova, N.I.Medvedeva, I. P.Baykov, etc.*, Russ. J. Bioorg. Chem., 36 (6), 841-848 (2010)
2. *O.B.Flekhter, L.T.Karachurina, L.R.Nigmatullin, etc.,* Russ. J. Bioorg. Chem., 28, 543-550 (2002).
3. A management on experimental (preclinical) to studying of new pharmacological substances, R.U.Habrieva (red.), Moscow (2005).

ВЛИЯНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ И ЭКСТРАКТОВ РАСТЕНИЙ НА ДЕЙСТВИЕ АНТИБИОТИКОВ В КУЛЬТУРАХ *ESCHERICHIA COLI*

Смирнова Г.В., Самойлова З.Ю., Октябрьский О.Н.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия
e-mail: smirnova@iegm.ru

Полифенолы растительного происхождения (таннины и флавоноиды) проявляют антиоксидантные свойства благодаря способности к связыванию радикалов и хелатированию ионов железа. Предобработка бактерий *E. coli* танниновой кислотой и флавонолом кверцетином повышала уровень экспрессии антиоксидантных генов *katG* и *sodA* и защищала клетки от окислительного стресса [1]. В последнее десятилетие накапливаются данные, что окислительный стресс включен в механизм бактерицидного действия антибиотиков, принадлежащих к различным классам [2]. Целью данной работы было изучение влияния экстрактов лекарственных растений и химически чистых полифенолов на действие антибиотиков в культурах *E. coli*.

В экспериментах использовали бактерии *E. coli* AB1157 (wt), NM23 (*katG::lacZ*) и QC772 (*sodA::lacZ*). Устойчивость к ампициллину, ципрофлоксацину, хлорамфениколу, рифампицину и канамицину исследовали путем определения МИК (минимальная ингибирующая концентрация) при использовании плашек с нанесенными в лунки двойными разведениями антибиотиков в бульоне. Одновременно с антибиотиками вносили экстракты растений (полынь понтийская, полынь австрийская, девясил иволистный, хамерион узколистный, грушанка круглолистная, лабазник обыкновенный, серпуха венценосная, пижма обыкновенная, василисник простой, конопля посевная и мелилотоидес плоскоплодный), а также таниновую кислоту, флавоноиды (кверцетин, катехин, нарингенин, гесперетин, рутин), хелаторы железа (дипиридил и дефероксамин) и тролокс (водорастворимый аналог витамина Е). Экстракты растений были приготовлены сотрудниками лаборатории фитохимии Центрального ботанического сада СО РАН. Экспрессию генов *katG* и *sodA* оценивали, измеряя активность β-галактозидазы методом Миллера.

Из всех изученных полифенолов только кверцетин и таннин вызывали повышение МИК для ципрофлоксацина. Хелаторы железа дипиридил и дефероксамин снижали значение МИК для хлорамфеникола. В остальных ситуациях присутствие полифенолов, хелаторов железа и тролокса в концентрации 0.1 мМ не влияло на МИК для антибиотиков. Водно-спиртовые экстракты растений в разной степени увеличивали МИК для ципрофлоксацина и канамицина. Влияние этих экстрактов на МИК для ампициллина, хлорамфеникола и рифампицина было выражено в меньшей степени. Максимальный защитный эффект от ципрофлоксацина проявляли серпуха венценосная, полынь понтийская и австрийская, лабазник и пижма. Оба вида полыни значительно повышали устойчивость бактерий к канамицину. Наблюдалась высокая корреляция МИК для ампициллина ($r = 0.9$) и ципрофлоксацина ($r = 0.84$) с концентрацией флавоноидов в экстрактах. МИК для канамицина в значительной степени коррелировала с содержанием таннинов ($r = 0.71$).

Поскольку модифицирующее действие полифенолов и растительных экстрактов на антибиотико-резистентность было в наибольшей степени выражено для ципрофлоксацина, этот антибиотик был подвергнут более детальному изучению. Присутствие в среде 0.1 мМ кверцетина или таннина оказывало значительный эффект на рост бактерий: удельная скорость роста (μ) через 1 час после обработки 2 мкг/мл ципрофлоксацина повышалась с 0.1 ± 0.03 час$^{-1}$ в контроле до 0.44 ± 0.04 час$^{-1}$ в случае кверцетина и до 0.26 ± 0.04 час$^{-1}$ – в случае таннина. При этом уровень экспрессии генов *katG* и *sodA* существенно уменьшался, что может свидетельствовать о снижении окислительного стресса, вызванного действием ципрофлоксацина. Также как таннин и кверцетин, все растительные экстракты, за исключением конопли, оказывали защитное воздействие на рост бактерий в присутствии ципрофлоксацина. Наиболее выраженный защитный эффект проявляли хамерион, лабазник и пижма, в присутствии которых и 3 мкг/мл ципрофлоксацина значение μ составляло 0.64 ± 0.03, 0.37 ± 0.05 и 0.23 ± 0.02 час$^{-1}$, соответственно, по сравнению с 0.03 ± 0.01 час$^{-1}$ в контроле с антибиотиком без экстрактов. При этом экстракты, обладающие более выраженным защитным действием, вызывали максимальное снижение уровня экспрессии антиоксидантных генов *katG* и *sodA*. Таким образом, модифицирующее действие полифенолов растительного происхождения на устойчивость бактерий *E. coli* к действию ципрофлоксацина связано, скорее всего, с их способностью снижать степень окислительного стресса, вызванного этим антибиотиком.

Работа поддержана грантом по Программе Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантом РФФИ-Урал №10-04-96--017.

Литература:

1. *G.V. Smirnova, Z.Y. Samoylova, N.G. Muzyka, O.N. Oktyabrsky*. // Influence of polyphenols on *Escherichia coli* resistance to oxidative stress - Free Radic. Biol. Med., 2009, vol. 46, p. 759-768
2. *M.A. Kohanski, D.J. Dwyer, B. Hayete, C.A. Lawrence, J.J. Collins* // A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics – Cell, 2007, vol. 130, p. 797-810

INFLUENCE OF POLYPHENOLS AND PLANT EXTRACTS ON ANTIBIOTIC ACTION IN CULTURES OF *ESCHERICHIA COLI*

Smirnova G.V., Samoylova Z.Yu., Oktyabrsky O.N.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia
e-mail: smirnova@iegm.ru

Plant polyphenols (tannins and flavonoids) possess antioxidant properties due to their radical scavenging and iron chelating activities. Pretreatment of *E. coli* cells with tannic acid and flavonol quercetin increased expression level of antioxidant genes *katG* and *sodA* and protected cells against oxidative stress [1]. In last decades there are some data obtained indicating that oxidative stress is involved in the mechanism of bactericidal action of antibiotics belonging to different classes [2]. The aim of this work was to investigate the influence of medicinal plant extracts and chemically pure polyphenols on action of antibiotics in *E. coli* cultures.

In experiments strains *E. coli* AB1157 (wt), NM23 (*katG::lacZ*) and QC772 (*sodA::lacZ*) were used. Resistance to ampicillin. ciproflaxacin, chloramphenicol, rifampicin and kanamycin was evaluated via determining MICs (minimal inhibitory concentrations) using the broth microdilution method. Concurrently with antibiotics plant extracts of *Artemisia pontica, Artemisia austriaca, Inula salicina, Chamerion angustifolium, Pyrola rotundifolia, Filipendula vulgaris, Serratula coronata, Tanacetum vulgare, Thalictrum simplex, Cannabis sativa, Melilotoides platycarpos* and as well as tannic acid, flavonoids (quercetin, catechin, naringenin, hesperetin, rutin), iron chelators (dipyridyl and deferoxamine) and trolox (a water-soluble analogue of vitamin E) were added. Plant extracts were provided by the collaborators from the Laboratory of Photochemistry of the Central Siberian Botanical Garden, Novosibirsk, Russia. Expression of the *katG* and *sodA* genes was evaluated by measurement of β-galactosidase activity using Miller's method.

Among all polyphenols tested only quercetin and tannin caused a MIC value increase for ciprofloxacin. Iron chelators dipyridyl and deferoxamine decreased MIC value for chloramphenicol. In all other cases presence of 0.1mM polyphenols, iron chelators and trolox did not affect antibiotic MICs. Water-ethanol plant extracts increased MICs of ciprofloxacin and kanamycin in a different manner. Influence of these extracts on ampicillin, chloramphenicol and rifampicin MICs was less significant. Maximal protective effect against ciprofloxacin was observed in *Serratula coronata, Artemisia pontica, Artemisia austriaca, Filipendula vulgaris* and *Tanacetum vulgare.* Both species of *Artemisia* remarkably increased bacterial resistance to kanamycin. A strong correlation was observed among both ampicillin (r = 0.9) and ciprofloxacin (r = 0.84) MICs and flavonoid content in the extracts. Kanamycin MICs considerably correlated with tannin content (r = 0.71).

Since modifying action of polyphenols and plant extracts on antibiotic resistance was marked to a larger extent in case of ciprofloxacin, this antibiotic was chosen for further investigation. Presence of 0.1 mM of quercetin or tannin caused a significant effect on bacterial growth: in an hour after treatment with 2 μg/ml of ciprofloxacin bacterial specific growth rate (μ) increased from 0.1 ± 0.03 h^{-1} in control to 0.44 ± 0.04 h^{-1} in case of quercetin and to 0.26 ± 0.04 h^{-1} in case of tannin. At the same time, level of *katG* and *sodA* expression was appreciably decreased indicating a possible reduction of oxidative stress caused by ciprofloxacin action. As well as tannin and quercetin, all the plant extracts with the exclusion of *Cannabis sativa* had protective effects on bacterial growth in the presence of ciprofloxacin. The most considerable protective effect was revealed in *Chamerion angustifolium, Filipendula vulgaris, Tanacetum vulgare,* in the presence of which and 3 μg/ml of ciprofloxacin the value of specific growth rate was 0.64 ± 0.03, 0.37 ± 0.05 и 0.23 ± 0.02 h^{-1}, respectively, compared to that of 0.03 ± 0.01 h^{-1} in the control with antibiotic but without extract. Along with this, extracts exhibiting a more remarkable protective effect caused a maximal decrease in antioxidant genes *katG* and *sodA* expression level.

Collectively, modifying effect of plant polyphenols on *E. coli* resistance to ciprofloxacin is probably related to their ability to decrease an extent of oxidative stress caused by this antibiotic.

This work was supported by the grant of Program MCB RAS and by the grant of Russian Foundation for Basic Research RFBR-Ural № 10-04-96017.

References:

1. *G.V. Smirnova, Z.Y. Samoylova, N.G. Muzyka, O.N. Oktyabrsky.* // Influence of polyphenols on *Escherichia coli* resistance to oxidative stress - Free Radic. Biol. Med., 2009, vol. 46, p. 759-768
2. *M.A. Kohanski, D.J. Dwyer, B. Hayete, C.A. Lawrence, J.J. Collins* // A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics – Cell, 2007, vol. 130, p. 797-810

НАТРІЙ ДИХЛОРАЦЕТАТ ЯК МОДИФІКАТОР ПРООКИСНО-АНТИОКСИДАНТНОГО СТАНУ У КЛІТИНАХ САРКОМИ 37

[1]Сорокіна Л. В., [2] Маковецька Л. І., [2]Діденко Г. В., [2]ГанжаО.Б., [1]Хижняк С.В., Войцицький В.М.

[1]Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail: sorokina_molbiol@mail.ru
[2]Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького, Київ, Україна

Формування злоякісних пухлин супроводжується активацією аеробного гліколізу на фоні дисфункції мітохондрій, що сприяє посиленню інвазивного росту пухлини. З метою подолання низки патологічних станів, пов'язаних із закисленням внутрішньо- та позаклітинного середовища, використовується натрій дихлорацетат (НДХА), здатний виступати селективним інгібітором кінази піруватдегідрогенази. Цей фермент фосфорилює піруватдегідрогеназний комплекс, який трансформує піруват до ацетил-КоА, у результаті чого активність комплексу знижується. Можна припустити, що НДХА, результатом дії якого є пригнічення аеробного гліколізу, сприяє посиленню генерації активних форм кисню в мітохондріях. Це обумовлює актуальність оцінки стану пероксидних процесів та відповіді системи антиоксидантного захисту в пухлинах за введення даної сполуки.

Метою роботи було дослідити вплив натрій дихлорацетату на інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ферментів у саркомі 37 мишей.

Дослідження проводили на білих мишах-самцях лінії Balb/c, яким перещеплювали клітини саркоми 37 (С37) у м'яз стегна. Тварини отримували внутріочеревинно НДХА у дозі 86 мг/кг на добу від моменту появи пухлин у тварин протягом 20-ти діб. З пухлинних клітин отримували фракцію мітохондрій (МХ) методом диференційного центрифугування. Визначали вміст ТБК-активних продуктів (ТБК-АП), активність супероксиддисмутази (СОД), каталази (Кат), глутатіонпероксидази (ГП) та вміст відновленого глутатіону (ГSH). Співвідношення прооксидантних та антиоксидантних факторів оцінювали з використанням методу H_2O_2-індукованої хемілюмінесценції люцигеніну.

Використання НДХА призводило до зниження темпу росту С37 на 32 % ($p<0,05$) в експоненціальній фазі та на 53 % ($p<0,05$) у терміни стаціонарного росту у порівнянні з контролем. Встановлено, що введення НДХА призводить до зниження активності ферментативної ланки антиоксидантної системи захисту в пухлині: активність Кат знижується у середньому на 48 % ($p <0,05$), СОД - на 25 % ($p<0,05$), а СОД мітохондрій - на 15 % ($p<0,05$). НДХА сприяє зниженню вмісту ГSH в пухлинах на 50 % ($p <0,05$) поряд із зниженням активності ГП у гомогенних препаратах пухлин на 30 % ($p <0,05$), а в МХ С37 – в середньому на 25 % ($p<0,05$). Вміст ТБК-АП у пухлинах за впливу ДХА зростає у середньому на 71 % ($p<0,05$), а МХ - 16 % ($p<0,05$). Крім того, з використанням методу H_2O_2-індукованої хемілюмінесценції люцигеніну показано, що за впливу НДХА показник світлосуми квантів для гомогенної фракції та МХ пухлин зростає у середньому на 23 % та 16 % ($p<0,05$), відповідно. Отримані результати вказують на посилення в С37 проокисних процесів за впливу НДХА.

Висновки. Введення натрій дихлорацетату тваринам з саркомою 37 обумовлює зростання інтенсивності проокисних процесів на фоні зниження активності антиоксидантних ферментів у клітинах пухлин, зокрема мітохондріях. Отримані результати дозволяють припускати здатність препарату посилювати генерацію активних форм кисню в саркомі 37, що може виступати однією із складових механізму протипухлинної дії натрій дихлорацетату.

THE MODIFICATION OF PROOXIDANT AND ANTIOXIDANT STATE OF SARCOMA 37 CELLS UNDER USING OF SODIUM DICHLOROACETATE

[1]Sorokina L.V., [2]Makovetska L.I., [2]Didenko G.V., [2]Ganzha O.B., [1]Khyzhnyak S.V., Voitsitsky V.M.

[1]Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine
e-mail: sorokina_molbiol@mail.ru
[2] R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The formation of malignant tumors is accompanied with the activation of aerobic glycolysis on the background of mitochondria dysfunction that facilitates the increase of the rate of invasive tumor growth. In order to overcome the set of pathological states associated with the acidulation of intra- and extracellular space sodium dichloroacetate (SDA) that selectively inhibits the kinase that phosphorylates piruvate dehydrogenase complex. In phosphorylated state the activity of this complex is decreased that leads to reduced amounts of NADH and acetyl-CoA in mitochondria. It could be assumed that the action of SDA that results in aerobic glycolysis inhibition facilitates the increase of reactive oxygen species (ROS) generation in mitochondria. This points out the relevance of the evaluation of oxidative processes state and the response of antioxidant system in tumors under SDA action.

The aim of the study was to investigate the influence of sodium dichloroacetate on the oxidative processes intensity and on the activity of antioxidant enzymes in murine sarcoma 37.

The experiments were performed using male-mice Balb/c with sarcoma 37 transplanted in thigh muscle.SDA was administered intraperitoneally in the daily dose of 86 mg/kg during 20 days starting from the moment of tumor onset. From the tumor cells mitochondrial fraction was obtained with the differential centrifugation technique. The contents of thiobarbituric acid active products (TB-AP) and the reduced glutathione (GSH), the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (Cat) and glutathione peroxidise (GP) had been evaluated. The ratio between the prooxidant and antioxidant factors was estimated using the method of H_2O_2-induced chemiluminescence of lucigenin.

The use of SDA leads to the decrease of the rate of sarcoma 37 growth by 32 % ($p<0,05$) in the exponential phase and by 53 % ($p<0,05$) at the growth steady state. SDA facilitates the suppression antioxidant enzymes activity: Cat activity decreases on average by 48 % ($p <0,05$), SOD activity - by 25 % ($p<0,05$), and mitochondrial SOD - by 15 % ($p<0,05$). SDA administration to mice leads to the depletion of GSH contents in tumors by 50 % ($p <0,05$) coupled with the decrease of GP activity in homogeneous preparations of tumors by 30 % ($p <0,05$), and in mitochondria of sarcoma 37 cells – on average by 25 % ($p<0,05$). The contents of TB-AP in tumors at the influence of DCA increases on average by 71 % ($p<0,05$), and in mitochondria – by 16 % ($p<0,05$). Moreover, using the method of H_2O_2-induced chemiluminescence of lucigenin it was shown that at the influence of DCA the value of light sum of quanta for homogeneous fraction and mitochondria of tumor increases on average by 23 and 16 % ($p<0,05$) correspondingly. These results denote the enhancing of prooxidant processes in sarcoma at the influence of SDA.

Thus, the administration of sodium dichloroacetate to animals with sarcoma 37 leads to the increase of prooxidant processes on the background of antioxidant enzyme activity decrease in tumor cells, particularly in mitochondria. The obtained results allow to assume the ability of the substance to increase generation of reactive oxygen species in sarcoma 37 cells, that could be considered as the component of the mechanism of SDA action.

ФЛАВОНОИДЫ - ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ, ОБЛАДАЮЩИЕ ШИРОКИМ СПЕКТРОМ АНТИВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ

[1] Старосила Д.Б., [2] Пальчиковская Л.И., [5] Атаманюк В.П., [5] Новик А.М., [2] Оболенская М.Ю., [3]Завелевич М.П., [3] Фильченков А.А., [3] Хаецкий И.К., [3] Бурлака А.П., [4] Варбанец Л.Д., [2] Васильченко А.В., [2]Дрогущенко Е.О., [2] Миня И.И., [2]Алексеева И.В., [1]Жаркова Л.Д., [1]Дядюн С.Т., [1]Рыбалко С.Л.

[1]ГУ Институт эпидемиологии и инфекционных заболеваний им. Л.В. Громашевского АМН Украины, Киев, Украина
e-mail: butenko@onconet.kiev.ua
[2]Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина
[3]Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина
[4]Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, , Киев, Украина
[5]НПО Экофарм, Киев, Украина

Цель работы - исследование антивирусных свойств и выявление возможных механизмов действия экстракта диких злаков *Deschampsia caespitosa* L. (*щучка дернистая*) и *Calamagrostis epigeios* L. (*вейник наземный*), действующими компонентами которого являются флавоноиды и флавоноидные гликозиды. Идентифицированным мажорным соединением экстракта оказался гликозилированный рамназин – 3',7-диметилкверцетин, представитель группы флавонолов (Рм). При изучении химической структуры было показано, что в состав гликозида рамназина входят остатки глюкозы и рамнозы. Кроме того, исследовали биологическую активность смеси синтезированных триметилкверцетина и тетраметилкверцетина (Рс).

Установлено, что рамназин является относительно нетоксичным в сравнении с близким по структуре флавонолом кверцетином.

Антивирусную активность препаратов проверяли на моделях гриппозной, герпетической инфекции, гепатита С и ВИЧ. Проведенные исследования показали, что препараты Рм и Рс ингибируют репродукцию вируса гриппа, герпеса, гепатита С и снижают уровень экспрессии р24 ВИЧ. Инактивация рамнозы рамнозидазой приводит к потере антивирусной активности Рм при исследовании репродукции вируса гриппа и суррогатного вируса ВБВД in vitro (модель инфекции ВГС), в то время как на моделях герпетической инфекции и ВИЧ Рм не теряет своей активности и после обработки рамнозидазой. Следовательно, антивирусная активность Рм связана не только с флавоновой структурой вещества, но и с его углеводным компонентом.

При изучении механизма действия Рм и Рс in vivo на крысах было показано, что они являются активными индукторами интерферона. Уровни экспрессии генов ИФНа, PCR, РНКазы L и 2-5 ОАС в печени крыс после введения животным Рм и Рс сопоставимы с таковыми при действии стандартного индуктора интерферона полиИ:полиЦ, а также при действии экзогенного интерферона альфа.

Одними из основных мишеней для действия антивирусных препаратов в цикле репродукции вирусов считаются РНК- и ДНК-полимеразные комплексы. Исходя из этого, тестирование *in vitro* Рм и Рс проводилось в модельных системах – транскрипционном (ДНК-зависимая РНК-полимераза бактериофага Т7) и репликативном (*Taq* ДНК-полимераза) комплексах. Показано, что исследованные соединения эффективно ингибируют синтез РНК в модельной системе транскрипции. Рассчитанные значения показателей IC_{50} для Рm и Рс, соответственно, равны 4,0 мкг/мл и 1,0 мкг/мл. Продемонстрировано также достоверное ингибирование синтеза фрагментов ДНК *Taq* ДНК-полимеразой в условиях ПЦР, но при более высоких концентрациях. Значения концентраций, при которых практически полностью отсутствует продукт для Рm и Рс соответственно равны 40 мкг/мл и 30 мкг/мл.

Рм и Рс в высоких дозах 150 мкмоль/л тормозят рост клеток Jurkat, индуцируя апоптоз в части клеточной популяции. Процесс апоптоза, индуцированного этими веществами, связан с активацией каспазы-9.

Установлено, что Рм и Рс являются эффективным средством регулирования скорости генерирования супероксидных радикалов нормальными и злокачественными клетками. В клетках Jurkat Рм в низких дозах 5 мкг/мл снижает скорость генерирования супероксидных радикалов клетками до нуля. Более высокие дозы этого вещества (50 мкг/мл) удерживали скорость генерирования супероксидных радикалов клетками на уровне 0,2 нмоль/10^5 клеток·мин.

Таким образом, как гликозид рамназина, так и три- и тетраметилированный кверцетин обладают широким спектром антивирусной активности при низком уровне токсичности и высоком индексе селективности. Показано, что эти соединения активны в отношении различных внутриклеточных мишеней. Можно ожидать, что эти вещества могут быть использованы при разработке новых противовирусных препаратов.

FLAVONOIDS - HETEROCYCLIC OXYGEN-CONTAINING COMPOUNDS POSSESSING BROAD SPECTRUM OF ANTIVIRAL ACTIVITY

[1] Starosyla D.B., [2] Palchikovskaia L.I., [5] Atamaniuk V.P., [5]Novik A.M., [2] Obolenskaia M.Yu., [3] Zavelevich M.P., [3] Philchenkov A.A., [3] Khaetskii I.K., [3]Burlaka A.P., [4]Varbanets L.D., [2] Vasilchenko A.V., [2]Droguschenko E.O., [2]Minia I.I., [2]Alekseeva I.V., [1]Zharkova L.D., [1] Diadiun S.T., [1] Rybalko S.L.

[1]Public Institution 'L.V. Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of AMS of Ukraine', Kiev, Ukraine, e-mail: butenko@onconet.kiev.ua
[2]Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine
[3]RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine
[4]D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine
[5]Ecopharm, Kiev, Ukraine

The aim of the work consists in studying the antiviral properties and elucidating the mechanisms of the activities of the purified extract from two grass species *Deschampsia caespitosa* L. and *Calamagrostis epigeios* L. The active substances identified in the extract are flavonoids and flavonoid glycosides. As the major component was identified glycosylated rhamnazin (Rm) – 3',7-Dimethylquercetin classified as flavonol with the residues of glucose and rhamnose have been demonstrated as the sugars. Furthermore, the biological activities of the mixture of synthesized trimethylquercetin and tetramethylquercetin (Rs) have been analyzed.

Rhamnazin has been shown relatively non-toxic as compared with quercetin (flavonol of the related structure). Antiviral activities of Rm and Rs were studied in the models of flu, herpes, hepatitis C and HIV infections. Rm and Rs have been shown to inhibit the reproduction of flu, herpes, and hepatitis C viruses and to lower the level of p24 HIV expression. When rhamnose was cleaved off with rhamnosidase, Rm activity against flu virus and BVDV in vitro was eliminated. Nevertheless, upon rhamnose cleavage, Rm was still active against herpes virus and HIV.

Rm and Rs *in vivo* have been shown to induce interferon in rats. The expression levels of IFN alpha, PCR, RNAse L and 2-5 OAS in rat liver upon administration of Rm or Rs were comparable with that attainable upon the action of polyI:polyC as standard IFN inducer or exogenous IFN alpha.

RNA- and DNA-polymerase complexes are considered as the major targets for antiviral drugs. Based on this fact, we have assayed Rm and Rs *in vitro* in models of transcription (DNA-dependent RNA polymerase of T7 phage) and replicative (*Taq* DNA-polymerase) complexes. The substances under study have been shown to inhibit effectively RNA synthesis in transcription model complex with IC_{50} for Rm and Rs being 4.0 µg/mL and 1.0 µg/mL, respectively. Synthesis of DNA fragments by *Taq* DNA-polymerase in PCR setting has been also inhibited but required higher concentrations. Inhibition above 99 % concentrations for Rm and Rs were 40 µg/mL and 30 µg/mL, correspondingly.

Rm and Rs at high doses 150 µM inhibit growth of Jurkat cells inducing apoptosis in a fraction of cell population. Apoptosis induced by these substances involved caspase-9 activation.

Rm and Rs have been shown to regulate effectively the generation rate of superoxide radicals by normal and malignant cells. In Jurkat cells low doses of Rm (5 µg/mL) are effective in decreasing the generation rate of superoxide radicals practically to zero level. Higher doses (50 µg/mL) maintained the generation rate of superoxide radicals at 0.2 nM/10^5 cells·min.

Therefore, glycosylated rhamnazin as well as trimethylquercetin and tetramethylquercetin possess the broad spectrum of antiviral activity with low toxicity and high selectivity index. The multiple intracellular targets of these substances have been demonstrated. The substances under study may be promising in development of novel antiviral drugs.

КАРДІОПРОТЕКТОРНІ ЕФЕКТИ НОВОГО ФТОРВМІСНОГО АКТИВАТОРА $K_{АТФ}$ КАНАЛІВ ФЛОКАЛІНУ

Струтинський Р.Б., Мойбенко О.О.

Інститут фізіології ім.. О.О. Богомольця НАН України, Київ, Україна
e-mail: ruslans@biph.kiev.ua

Останнім часом значну увагу дослідників привертають так звані АТФ-чутливі калієві ($K_{АТФ}$) канали. Вони, в деякій мірі, особливі - відкриваються при зменшенні енергоресурсів в клітині, зокрема АТФ. Їх активація має потужне протекторне значення, особливо при ішемії і гіпоксії тканин, і є одним з основних ендогенних механізмів захисту клітини, а відкривати ці канали, як виявилось, можливо, і фармакологічним шляхом, за допомогою активаторів цих каналів. Завдяки співпраці співробітників Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця (академік НАН України О.О. Мойбенко, к.б.н Р.Б. Струтинський) і Інституту органічної хімії НАН України (проф. Л.М. Ягупольський) було створено та досліджено декілька нових фторвмісних активаторів цих каналів. В результаті проведеної роботи виявилось, що одним з найперспективніших фармакологічних активаторів цих каналів є флокалін. По класифікації калієвих каналів він відноситься до сімейства цианогуанідинів і є активатором каналів як сарколемальної так і мітохондріальної мембран. Одною із важливих переваг флокаліна над іншими активаторами $K_{АТФ}$ каналів є досить низька токсичність – напів-летальна доза для білих щурів складає 2150 мг/кг. Метою нашої роботи було дослідження кардіопротекторних ефектів флокаліна.

В експериментах на анестезованих собаках з відтворенням експериментальної ішемії (90хв) та реперфузії (180хв) показано кардіопротекторний вплив доішемічної активації $K_{АТФ}$ каналів за допомогою внутрішньовенного введення флокаліна, в дозі 0,1 мг/кг, що практично не змінювала параметри гемодинаміки за умов нормоксії. Таким чином, проведене дослідження впливу флокаліна на зміни кардіогемодинаміки та біохімічних показників артеріальної крові під час ішемії-реперфузії міокарду продемонстрували певні особливості розвитку ішемічно-реперфузійного синдрому в умовах стимуляції активності $K_{АТФ}$ каналів. До позитивних впливів флокаліну, що можуть сприяти його кардіопротекторним ефектам, можна віднести попередження підвищення загально-переферичного опору, опору коронарних судин та відносне збереження показників скоротливої активності міокарда в період реперфузії. Позитивним ефектом флокаліну можна також вважати помірне зниження артеріального тиску, що послаблює навантаження на уражене серце і сприяє збереженню серцевого викиду в перші години ішемії. Аналіз біохімічних показників крові показав, що флокалін пригнічує вільнорадикальні реакції та має антиокиснювальні властивості: зменшує вміст H_2O_2, такого маркера оксидативного стресу як малоновий диальдегід, та NO_3^- (останнє може свідчити про зменшення утворення пероксинітритів) в артеріальній крові під час ішемії та реперфузії міокарда, запобігає зниженню активності ферментів антиоксидантної системи: каталази та супероксиддисмутази. Практично незмінний вміст в крові на протязі всього експерименту низькомолекулярних нітрозотиолів та збільшення рівня NO_2^- під час реперфузії можуть свідчити про підтримання системи оксиду азоту в належному стані та протекторний вплив флокаліну при ішемії-реперфузії міокарда. Більше того, під час створення ішемії-реперфузії флокалін запобігав підвищенню активності ферменту індуцибельної NOS (а отже, і можливого утворення пероксинітритів при взаємодії NO з супероксидом) та значно підвищував активність ферменту конститутивної NOS (eNOS+mNOS). Гіперполяризація мембрани та зменшення збудливості кардіоміоциту призводила до зменшення входу Ca^{2+} в клітину і відповідно до пригнічення активності Ca^{2+}-залежних ферментів, зокрема фосфоліпази A_2. Свідченням чого може бути зменшення в артеріальній крові арахідонової кислоти та її похідних, лейкотриєну LTC_4 та тромбоксану TxB_2. Практично незмінний вміст в крові неорганічного фосфору та сечової кислоти під час ішемії-реперфузії при введенні флокаліну може свідчити про запобігання повної деградації АТФ, а, отже, і утворення як супероксиданіону за дії ксантиноксидази, так і пероксинітриту при взаємодії останнього з оксидом азоту. Всі вище перераховані властивості флокаліну сприяють зменшенню розміру зони інфаркту міокарда після ішемії-реперфузії порівняно з контролем на 37%.

CARDIOPROTECTIVE EFFECTS OF THE NEW FLUORINE-CONTAINING OPENER OF K_{ATP} CHANNELS FLOCALIN

Strutynskyi R.B., Moybenko O.O.

A.A.Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: ruslans@biph.kiev.ua

At present, the great attention of the researchers is paid for ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels. These membrane channels have some specialties - they are opened under depletion of energy resource in cells, in particular, ATP. Their activation has strong defensive importance, particularly under hypoxia and ischemia of tissues, and is one of the main endogenous mechanisms of cellular protection. It has appeared possible to open these channels pharmacologically with using of K_{ATP} openers. The new fluorine-containing opener flocalin pertains to these pharmacological group, which is an object of our studies. Flocalin has been created as a result of the long-term collaboration of Bogomoletz Institute Physiology of Physiology (member of the NASU, prof. Alexey Moibenko, PhD Ruslan Strutynskyi) and Organic Chemistry Institute (prof. Lev Yagupolskii) of the NASU. Flocalin is a member of cyanoguanidines family and is the opener of sarcolemmal and mitochondrial ATP-sensitive potassium channel. One of major advantages of flocalin is low toxicity - half lethal dose for rats is 2150 mg/kg. Purpose of our current work was to study the cardioprotective effects of flocalin.

In experiments on anesthetized dogs with experimental ischemia (90 min) and reperfusion (180 min) we show the cardioprotective effect of preischemic activation of K_{ATP} using intravenous injection of flokain in concentration of 0.1 mg/kg, while it did not change hemodynamic parameters under normoxic conditions. Thus, our investigations of flokalin influence on changes in hemodynamic and arterial blood biochemical parameters during myocardium ischemia-reperfusion have shown some peculiarities of modeled syndrome development under K_{ATP}-channels stimulation. From our point of view, the positive influence of flocalin, which can support its cardioprotective effects, it is possible to reduce the increase of general peripheral resistance, resistance of coronary vessels, and relative preservation of myocardium contractility in the period of reperfusion. Also this positive effect can be referred to blood pressure lowering, which leads to reduced loading on the injured heart and promote cardiac output retention during the first hours of ischemia. Analysis of blood biochemical parameters revealed that flocalin suppressed reactive oxygen species reactions and revealed anti-oxidative properties reducing quantity of H_2O_2, oxidative stress marker, malone dialdehyde, and NO_3^- (latter it can be interpreted as a reduction in peroxinitrite formation), in arterial blood during ischemia and reperfusion of myocardium, which high levels are typical of ischemia-reperfusion injury. Flokalin prevented the decline of catalase and superoxide dismutase activity. Practically constant content of low-molecular nitrosothiols in blood during the whole experiment and increase in the level of NO_2^- during the reperfusion can be indicative of intact functions of the NO system and protective influence of flocalin during the ischemia-reperfusion of myocardium. Moreover, flokalin reduced activity iNOS under experimental modeling of acute ischemia-reperfusion (it can be interpreted as a reduction in peroxinitrite formation) and increaseed activity cNOS. Much of these cardioprotective moments apparently come from opening of K_{ATP} channels by flokalin, that decrease cardiomyocytes' electrical and contractile activity, retardation of metabolic processes and decrease in voltage-dependent Ca^{2+} entry. The latter helps to prevent Ca^{2+}-dependent degradation of membrane phospholipids and elevation of the content of arachidonic acid and of its derivatives, leukotrienes and thromboxanes that have arhythmogenic and coronary constrictive activities. Practically unchanged content of inorganic phosphorus and uric acid in blood during ischemia-reperfusion under preischemic injection of flocalin indicates that there is a prevention of ATP degradation and formation of both superoxide anion by xantinoxidase and peroxinitrite by its interaction with nitric oxide. All the mentioned properties of flocalin, related with the changes in biochemical parameters of arterial blood, together with the changes in hemodynamic parameters, result in decrease of infarct size in myocardium after ischemia-reperfusion by 37% versus control experiments.

ВПЛИВ МУЛЬТИПРОБІОТИКА «СИМБІТЕР® АЦИДОФІЛЬНИЙ» НА ОКИСНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ БАЛАНС В СИРОВАТЦІ КРОВІ У ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

[1]Торгало Л.О., [1]Дворщенко К.О., [1]Остапченко Л.І., [1]Берегова Т.В., [2]Янковський Д.С.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail: alisa210@meta.ua
НВК «О.Д. Пролісок», с. Велика Вільшанка, Васильківський р-н, Київська обл., Україна

Враховуючи сучасні дані про порушення мікрофлори кишечнику з віком та вільно-радикальну і імунологічну теорії старіння організму є важливим дослідити стан перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та активність ферментів антиоксидантного захисту супероксиддисмутази (СОД) та каталази (КАТ) в сироватці крові щурів, яким для підтримання мікрофлори кишечника та імунітету періодично упродовж 9-ти місяців вводили мультипробіотик «Симбітер®».

Дослідження проведені в умовах хронічного експерименту на 30 білих нелінійних щурах, які народжені різними самками в один день, та були поділені на 2 групи (контрольну та основну) і знаходились на стандартному раціоні віварію. Щурам контрольної групи у віці 1,5, 4,5 та 7,5 місяців упродовж 10 днів перорально вводили 0,5 мл водопровідної води. Щурам основної групи в перші 10 днів після народження щоденно в ротову порожнину вводили 1 краплю мультипробіотика «Симбітер® ацидофільний». В послідуючому цим щурам у віці 1,5, 4,5 та 7,5 місяців упродовж 10 днів перорально вводили мультипробіотик «Симбітер® ацидофільний» концентрований (0,14 мл/кг) (НВК «О.Д. Пролісок»), розчиненого у 0,5 мл води. У віці 3, 6 та 9 місяців з кожної групи щурів відбирали по 5 тварин, які умертвляли летальною дозою уретану. В сироватці крові визначали вміст продуктів ПОЛ та активність СОД і КАТ. Вміст дієнових кон'югатів (ДК) визначали в гептан-ізопропанольному екстракті, вміст ТБК-активних сполук (ТБК-АС) визначали по реакції з тіобарбітуровою кислотою та вміст шиффових основ визначали флуориметричним методом. Оцінку активності СОД проводили з використанням нітросинього тетразолію, а КАТ – за зменшенням кількості H_2O_2 у розчині після інкубації в оптимальних умовах.

Дослідження, проведені на тваринах контрольної групи, показали, що у порівнянні з щурами 3-х місячного віку у щурів 6-ти місячного віку вміст продуктів ПОЛ в сироватці крові мав тенденцію до зростання ($p>0,05$). У щурів 9-ти місячного віку вміст ДК, ТБК-АС та ШО зростав у порівнянні з щурами 3-х місячного віку відповідно на 22,5% ($p<0,05$), 18,6% ($p<0,05$) та 35,8% ($p<0,05$). Вік щурів не впливав на активність СОД та КАТ в сироватці крові. У щурів 3-х місячного віку, яким упродовж життя двічі по 10 днів вводили Симбітер, вміст ДК, ТБК-АС та ШО в сироватці крові був меншим у порівнянні з контрольною групою 3-х місячних щурів на 19,2% ($p>0,05$), 27,2% ($p<0,05$) та 19,9% ($p>0,05$) відповідно. Введення Симбітеру (двічі по 10 днів упродовж 3-х місяців) не впливало на активність СОД та КАТ в сироватці крові щурів 3-х місячного віку. У щурів 6-ти місячного віку, яким упродовж життя тричі по 10 днів вводили Симбітер, вміст ДК, ТБК-АС та ШО в сироватці крові був меншим у порівнянні з 6-х місячними щурами контрольної групи відповідно на 22,8% ($p<0,05$), 25,0% ($p<0,01$) та 31,2% ($p<0,01$). Введення Симбітеру (тричі по 10 днів упродовж 6-ти місяців) не впливало на активність СОД та на 64,1% ($p<0,001$) збільшувало активність КАТ. У щурів 9-ти місячного віку, яким упродовж життя 4 рази по 10 днів вводили Симбітер, вміст ДК, ТБК-АС та ШО в сироватці крові був меншим у порівнянні з 9-ти місячними щурами контрольної групи відповідно на 27,5% ($p<0,05$), 31,9% ($p<0,01$) та 28,6% ($p<0,01$). Введення Симбітеру (4 рази по 10 днів упродовж 9-ти місяців) приводило до збільшення активності СОД та КАТ на 34,4% ($p<0,05$) та 40,2% ($p<0,01$) відповідно.

Отримані дані свідчать про те, що, по-перше, старіння щурів супроводжується накопиченням продуктів ПОЛ в сироватці крові при незмінній активності СОД та КАТ. По-друге, курсове введення Симбітеру нормалізувало окисно-антиоксидантний баланс в сироватці крові, що свідчить про здатність Симбітеру уповільнювати процес старіння.

THE INFLUENCE OF MULTIPROBIOTIC «SYMBITER® ACIDOPHILIC» ON OXIDIZED/ANTIOXIDANT BALANCE IN BLOOD SERUM OF RATS OF DIFFERENT AGE

[1]Torgalo L.O., [1]Dvorschenko K.O., [1]Ostapchenko L.I., [1]Beregova T.V., [2]Yankovsky D.S.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine
e-mail: alisa210@meta.ua
Scientific and production company «O.D. Prolisok», village Velyka Vilshanka, Vasilkovsky region, Ukraine

In consideration of current data intestinal microflora disturbance with age and free-radical and immunological theories of aging it is important to examine the state of lipid peroxidation (LPO) and activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in blood serum of rats that to maintain the intestinal microflora and immunity periodically within 9 months was injected multyprobiotic "Symbiter ®».

Research carried out in chronic experiments on 30 white rats born to different females in one day, and were divided into 2 groups (control and basic) and placed in standard vivarium diet. Rats of the control group at the age of 1,5, 4,5 and 7.5 months during the 10 days orally administered 0.5 ml of tap water. Rats of the main group in the first 10 days after birth in the oral cavity daily injected 1 drop multiprobiotic Symbiter ® acidophilic. In successive these rats aged 1,5, 4,5 and 7.5 months during the 10 days orally administered multyprobiotic "Symbiter® acidophilic concentrated (0.14 mg/kg) (Scientific and production company «O.D. Prolisok»), dissolved in 0.5 ml of water. At the age of 3, 6 and 9 months from each group of rats were taken to 5 animals that were killed with a lethal dose of urethane. In blood serum we determined the content of LPO products and activity SOD and CAT. The content of diene conjugates (DC) was measured in heptane-isopropanole, the content of thiobarbituric acid-active compounds (TBA-AS) was determined by reaction with thiobarbituric acid and contents of shyffovy basis (SHO) was determined by the method of fluorometry. Evaluation of SOD activity was performed using tetrazolium nitroblue. Evaluation of CAT activity was performed by reduction of number of H_2O_2 in solution after incubation in optimal conditions.

Studies done on animals of the control group, showed that compared with rats 3 months of age in rats 6 months of age content of LPO products in blood serum tended to increase ($p > 0,05$). In rats 9-month old content of DC, TBA-AS, SHO were increased compared with rats 3 months of age respectively by 22,5% ($p<0,05$), 18,6% ($p<0,05$) and 35,8% ($p<0,05$). Age rats did not influence the activity of SOD and CAT in blood serum. In rats 3 months of age that were injected Symbiter (2 courses for 10 days during 3 months), the content of DC, TBA-AS, SHO in blood serum was lower compared with the control group 3 months rats by 19,2% ($p > 0,05$), 27,2% ($p <0,05$) and 19,9% ($p > 0,05$) respectively. Introduction of Simbiter (2 courses for 10 days during 3 months) did not influence the activity of SOD and CAT in blood serum of rats 3 months of age. In rats 6 months of age that were injected Symbiter (3 courses for 10 days during 3 months), content of DC, TBA-AS and SHO in serum was lower in comparison with 6-month control group of rats respectively by 22,8% ($p < 0,05$), 25,0% ($p <0,01$) and 31,2% ($p <0,01$). Introduction of Symbiter (3 courses for 10 days during 6 months) had no effect on SOD activity and increased CAT activity by 64,1% ($p <0,001$). In rats 9 months of age that were injected Symbiter (4 courses for 10 days during 9 months), content of DC, TBA-AS and SHO in serum was lower in comparison with 9-month control group of rats according to 27,5% ($p <0,05$), 31,9% ($p <0,01$) and 28,6% ($p <0,01$). Introduction of Simbiter (4 times in 10 days over 9 months) resulted in increased activity of SOD and CAT to 34,4% ($p <0,05$) and 40,2% ($p <0,01$) respectively.

These data suggest that, firstly, aging rats is accompanied by accumulation of LPO products in blood serum with constant activity of SOD and CAT. Secondly, course introduction of Simbiter normalized oxidation-antioxidant balance in blood serum indicating the ability of Simbiter to slow the aging process.

ВЛИЯНИЕ ГЛИПРОЛИНОВ НА ГЛИКОПРОТЕИДНЫЙ СОСТАВ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА У КРЫС В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЭРОЗИВНО-ЯЗВЕННЫХ ПОРАЖЕНИЙ

[1]Фалалеева Т.М., [1]Береговая Т.В., [2]Самонина Г.Е.

[1] Киевский национальный университет имени Т.Г. Шевченко, Киев, Украина
e-mail: tfalalyeyeva@mail.ru
[2]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
e-mail: g_samonina@mail.ru

Несмотря на успехи в гастроэнтерологии, распространенность язвенной болезни по-прежнему не имеет тенденции к снижению, а возникающие осложнения зачастую угрожают жизни больного и требуют хирургического вмешательства. Современные экспериментальные исследования направлены на поиск полифункциональных препаратов, в том числе и регуляторных пептидов, влияющих на различные патогенетические факторы, лежащие в основе язвенной болезни, и которые в наименьшей степени вызывают побочные эффекты. К таким средствам можно отнести регуляторные эндогенные пептиды, применение которых в качестве антиульцерогенных препаратов в настоящее время весьма ограничено. Изучению семейства глипролинов, представленного короткими пролин- и глицинсодержащими пептидами PGP, GP, PG и др., которые являются эндогенными регуляторными пептидами, сегодня уделяется особое внимание в связи с перспективой разработки на их основе природных гастропротекторов. Известно, что важную роль в отражении процессов внутриклеточной трансформации и межклеточного взаимодействия при развитии язвы играют гликоконьюгаты плазматических мембран, поэтому в данной роботе мы решили провести морфологический и лектиногистохимический анализ слизистой оболочки желудка (СОЖ) крыс в условиях развития эрозивно-язвенных поражений до и после воздействия глипролинов.

Исследования проведены в условиях острого эксперимента на 72 белых нелинейных крысах самцах весом 180-220 г. Язвенно-эрозивные поражения СОЖ у крыс вызывали методом иммобилизационного водоиммерсионного стресса и внутрижелудочным введением 1 мл/200 г веса 96° этилового спирта. PGP, PG, GP вводили внутрибрюшинно в дозе 3,7 мкмоль/кг за 15 минут до нанесения стресса или введения этанола. Через 3 часа после действия стресса и через 1 час после введения этанола животных умертвляли. Желудок фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 5-7 мкм изготавливали на роторном микротоме, красили гематоксилином и эозином. Цитотопографию рецепторов лектинов изучали по установленной методике (Луцик А.Д., 1989), используя набор из семи лектинов разной углеводной специфичности: LABA, специфический к αLFuc; SBA - αNAcDGal; WGA - NAcDGlc→NAcNeu; PNA - ßDGal; SNA - Neu5Ac/2→6Gal; HPA - NAcαDGal, RCA - ßDGal→βDGalNAc (НДЛ „Лектинотест”, м. Львов).

В результате гистологического анализа СОЖ крыс контрольной группы установлено, что слизистая была обычного строения, большинство использованных нами лектинов (HPA, WGA, SBA, RCA), связывались с клетками эпителиальной пластинки. Преобладание N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина в составе слизисто-бикарбонатного барьера обеспечивает его вязкость и проницаемость, а также процессы межклеточного взаимодействия в СОЖ. При исследовании гистологических препаратов желудка крыс, которые подвергались воздействию ульцерогенных факторов, наблюдалась лейкоцитарная инфильтрация слизистой и подслизистой оболочек. Весь поверхностный эпителий был подвергнут десквамации, а слизь в железах густая и малопрозрачная. Поверхность СОЖ без слизи. Ядра клеток были расположены хаотично. Местами - участки язв и эрозий. Также мы заметили модификацию рецепторов лектинов в структурных компонентах СОЖ, основные изменения углеводного профиля касались поверхностного эпителия и мукоцитов. В составе слизисто-бикарбонатного барьера появлялись углеводные детерминанты αLFuc (LABA), βDGal (PNA), Neu5Ac/2→6Gal (SNA), что свидетельствует в пользу незрелости производимого муцинового секрета.

Профилактическое введение PGP, GP, PG в значительной степени предотвращало структурные изменения в СОЖ: конкретные участки язв отсутствовали, подслизистая оболочка без отека, показано общее кровенаполнение сосудов всех оболочек желудка крыс и восстановление структурной организации СОЖ. Хотя признаки воспаления сохранялись. Также профилактическое введение пролинсодержащих пептидов в значительной степени приводило к стабилизации гликопротеидного состава СОЖ, нарушенного действием ульцерогенных факторов. При эрозивно-язвенных поражениях, вызванных стрессом и этанолом, основные изменения углеводного профиля касались поверхностного эпителия и мукоцитов. Мукоциты желез продуцируют секрет богатый гликозаминогликанами и вместе с эпителиоцитами СОЖ, которые тонким слоем покрывает эпителий желудка, и обеспечивают защитную функцию, а именно, образуют основную систему защиты СОЖ от повреждающих факторов. Глипролины модифицируют гликоконьюгаты слизисто-бикарбонатного барьера, что приводит к изменению вязкости и предотвращает проникновение повреждающих факторов.

Сделан вывод, что в условиях развития эрозивно-язвенных поражений в СОЖ крыс, вызванных действием острого стресса и этанола, происходят деструктивные изменения паренхимальных и стромальных элементов, в состав которых входят коллагеновые и эластиновые волокна, а введение компонентов коллагена (глипролинов) предотвращает повреждение и стимулирует регенерацию коллагеновых волокон стромы.

THE INFLUENCE OF GLYPROLINES ON GLYCOPROTEID COMPOSITION IN GASTRIC MUCOSA OF RATS UNDER THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL EROSIVE AND ULCERATIVE LESIONS

[1]Falalyeyeva T.V., [1]Beregova T.V., [2]Samonina G.E.

[1]Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine
e-mail: tfalalyeyeva@mail.ru
[2]M.V. Lomonosow Moscow State University, Russia
e-mail: g_samonina@mail.ru

Despite advances in gastroenterology, the prevalence of peptic ulcer disease hasn't a downward trend, moreover concomitant complications often threaten the lives of patients and require surgical intervention. Modern experimental researches aim at finding multifunctional drugs, including regulatory peptides, that affect different pathogenetic factors underlying ulcer disease and are least likely to cause side effects. Such remedies include endogenous regulatory peptides, usage of which as antiulcerogenic drugs are currently very limited. Today researchers pay special attention to study of a glyprolines family presented with short proline and glycine containing peptides such as PGP, GP, PG, etc., which are endogenous regulatory peptides, due to prospect of the development of natural gastroprotectors on their basis. It is known that glycoconjugates of plasma membranes have an important role in the reflection of the intracellular processes of transformation and cell-cell interactions during the development of ulcer, so in this study we decided to conduct a morphological and lektinohistochemical analysis of gastric mucosa (GM) of rats under the development of erosive and ulcerative lesions before and after exposure to glyprolines.

Investigations were carried out in acute experiments on 72 white nonlinear male rats weighing 180-220 g. The erosive and ulcerative lesions in the rat GM were provoked with water immersion restraint immobilization stress or intragastric injection of 96° ethanol in dose of 1 ml/200 g of body weight. PGP, PG, GP were injected intraperitoneally in a dose of 3.7 mmol/kg 15 minutes prior to the application of stress or injection of ethanol. 3 hours after the action of stress or 1 h after injection of ethanol animals were killed. The stomachs were fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections 5-7 microns thick were made on a rotary microtome and dyed with hematoxylin and eosin. Cytotopography of lectin receptors was studied under the established procedure (Lutsik A.D., 1989), using a set of seven lectins of different carbohydrate specificity: LABA, specific to αLFuc; SBA - αNAcDGal; WGA - NAcDGlc → NAcNeu; PNA - ßDGal; SNA - Neu5Ac/2 → 6Gal; HPA - NAcαDGal, RCA - ßDGal → βDGalNAc (SRL "Lectinotest", Lviv).

Using histological analysis of the GM of rats from control group it was found that the mucosa had normal structure, most of used lectins (HPA, WGA, SBA, RCA) bound to cells of the epithelial lamina. The predominance of N-acetyl-D-glucosamine and N-acetylgalactosamine in the mucous-bicarbonate barrier provides the viscosity and permeability, as well as the processes of intercellular interactions in GM. Examining of histological preparations of the stomachs of rats that were exposed to ulcerogenic factors, we observed leukocyte infiltration of mucosal and submucosal membranes. The entire surface epithelium was subjected to desquamation and mucus in glands was dense and not transparent. There wasn't mucus on the GM surface. The cell nuclei were located chaotically. There were areas of ulcerations and erosions. We have also noticed a modification of lectins receptors in the structural components of the GM, the main changes related to the carbohydrate profile of the surface epithelium and myxocytes. In the composition of mucous-bicarbonate barrier carbohydrate determinants such as αLFuc (LABA), βDGal (PNA), Neu5Ac / 2 → 6Gal (SNA) appeared, which are indicators of immaturity of produced mucigenic secretion.

Prophylactic introduction of PGP, GP, PG significantly prevented the structural changes in GM: specific areas of ulceration were absent, there wasn't edema in submucosal membrane, it was shown the total filling of blood vessels in all membranes of the stomach of rats and the restoration of the structural organization of the GM. But in spite of that signs of inflammation persisted. Also, prophylactic introduction of proline containing peptides substantially led to the stabilization of glycoproteid structure of the GM impaired by action of ulcerogenic factors. When erosive and ulcerative lesions caused by stress and ethanol appear, the main changes related to the carbohydrate profile of the surface epithelium and myxocytes. Myxocytes of glands produce the secretion rich in glycosaminoglycans and together with epithelial cells of the GM provide a protective function, namely, form the primary system of protection of the GM from damaging factors. Glyprolines modify glycoconjugates of mucous-bicarbonate barrier, which leads to a change in viscosity and prevents the penetration of damaging factors.

It was concluded that under the development of erosive and ulcerative lesions in rat GM caused by the influence of acute stress and ethanol, destructive changes of parenchymal and stromal elements, which include collagen and elastin fibers, occur, and the introduction of components of collagen (glyprolines) prevents damage and stimulates regeneration of the collagen fibers of the stroma.

ВПЛИВ ОЦТОВОКИСЛОГО ЦИНКУ НА АКТИВНІСТЬ NO-СИНТАЗИ КЛІТИН ПЕЧІНКИ І МОЗКУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

Харченко О.І., Максимович Я.С., Богун Л.І.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, кафедра біохімії
Київ, Україна, e-mail: slavamaks@gmail.com

Розкриття характеру впливу гострої і хронічної алкогольної інтоксикації на здоров'я людини є однією з актуальних і до кінця не вирішених завдань сучасної медицини. Протягом останніх 10 років у всьому світі і, зокрема, в Україні, відзначається тенденція до поширення, омолодження та посилення наслідків цього захворювання. В основі розвитку алкоголізму лежать глибокі зміни метаболізму, спричинені розладом функціонування різних метаболічних шляхів, зокрема порушення продукції оксиду азоту (NO), що має широкий спектр біорегуляторної дії. До складу всіх ізоформ синтази оксиду азоту (NOS), яка відповідає за утворення NO в організмі, входять іони цинку. Відомо, що за умов хронічної алкогольної інтоксикації спостерігається дефіцит цього мікроелементу у ряді органів, внаслідок чого, можливо, змінюється активність даного ферменту. З метою корекції нестачі цинку використовують його солі, серед яких низькою токсичністю характеризується оцтовокислий цинк. Тому метою наших досліджень було визначити активність NO-синтази та вплив оцтовокислого цинку на активність цього ферменту у клітинах печінки і мозку щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією.

Дослідження проводили на щурах (самцях) масою 180-200 г, що утримувались на стандартному раціоні віварію 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 викликалась за стандартною методикою М.Х. Халілова і Ш.А. Закірходжаєва; 3-тя група – щури з хронічною алкогольною інтоксикацією, яким додатково вводили оцтовокислий цинк в дозі 0,2 г на 100 г маси тварини. Клітини печінки і мозку виділяли за стандартною методикою на 4, 6, 11, 16 та 21 доби після початку експерименту. Активність NO-синтази визначали колориметрично за накопиченням нітрит-іонів - стабільних продуктів аеробного окислення NO.

У результаті досліджень нами було встановлено, що в гепатоцитах щурів за умов хронічної алкогольної інтоксикації активність NO-синтази поступово зростала, причому найбільші зміни спостерігалися на 21-шу добу (в 3,3 рази вища за контроль). Введення оцтовокислого цинку за умов хронічної дії етанолу на більш ранніх етапах дослідження (7-ма та 11-та доба) призводило до зростання активності NO-синтази в 2 рази в порівнянні з контрольними показниками. У подальшому активність ферменту знижувалась і на 21 добу була в 1,2 рази нижчою по відношенню до контролю. У порівнянні з відповідними термінами досліджень при дії етанолу активність NO-синтази на 4-ту добу суттєво не відрізнялась, а на 7-му, 11-ту, 16-ту та 21-шу добу була в 1,7; 1,3; 1,6 та 3,8 разів нижчою відповідно.

Дослідження функціонування NO-синтази у клітинах головного мозку є важливим у зв'язку з тим, що оксид азоту залучений у процеси розвитку як органічних порушень, так і поведінкових дисфункцій за умов хронічного екзогенного надходження етанолу.

У результаті проведених досліджень нами встановлено, що у клітинах мозку при дії етанолу активність NO-синтази поступово зростала протягом усіх етапів експерименту і на 21-шу добу була в 3,6 разів вищою за контрольні показники. Введення досліджуваної сполуки за умов хронічної алкогольної інтоксикації в клітинах мозку приводило до менш значного зростання активності NO-синтази, яке на 4-ту, 11-ту та 21-шу добу було відповідно в 1,8; 2,3 та 1,3 рази вищим від контролю. В порівнянні з відповідним часовим періодом при дії тільки етанолу активність NO-синтази на 4-ту добу була дещо нижчою (в 1,2 рази), на 7-му та 11-ту добу значно не відрізнялась, а на 16-ту та 21-шу – була нижчою відповідно в 1,7 та 2,7 разів.

Встановлене нами зростання загальної активності NO-синтази клітин печінки і мозку щурів при хронічній алкогольній інтоксикації можливо відбувалось за рахунок зростання експресії індуцибельної ізоформи NOS, що продукує значно більше NO у порівнянні з ендотеліальною чи нейрональною NOS. У подальшому накопичення вмісту оксиду азоту у цих клітинах може бути одним із факторів посилення токсичної дії етанолу.

Таким чином, нами продемонстровано поступове зростання активності NO-синтази у досліджуваних органах при хронічній алкогольній інтоксикації, що у подальшому може призвести до посилення оксидативного стресу та розвитку патологічних пошкоджень. Введення оцтовокислого цинку за досліджуваної патології приводило до поступового зниження активності ферменту, особливо на пізніх етапах дослідження, причому у гепатоцитах спостерігалась повна нормалізація його активності. Це свідчить на користь можливого використання досліджуваної сполуки для корекції метаболічних порушень, викликаних хронічним надходженням етанолу і дає підстави для його подальших досліджень як потенційного лікувального засобу за умов хронічного алкоголізму.

ACTION OF ZINC ACETATE ON NO-SYNTHASE ACTIVITY IN LIVER AND BRAIN CELLS UNDER CHRONIC ALCOHOLIC INTOXICATION

Kharchenko O.I., Maksymovych Ia.S., Bogun L.I.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, department of biochemistry
Kyiv, Ukraine, e-mail: slavamaks@gmail.com

Disclosure of nature of the influence of acute and chronic intoxication on human health is one of actual and unsolved problems of modern medicine. During last 10 years in world-wide and in Ukraine the tendency to spread, rejuvenation and aggravation of consequences of this disease has observed. The development of alcoholism is induced by the deep changes of metabolism evoked by disturbances of functioning of different metabolic pathways especially the disorders of nitric oxide (NO) production witch has extensive specter of bioregulatory action. NO is generated by the zincic enzyme nitric oxide synthase (NOS). Chronic alcoholic intoxication is accompanied by deficiency of this microelement in different organs. Such disturbance may cause changes of NOS activity. Zinc salts, particularly low-toxic zinc acetate, are used for correction of zinc deficiency. Thus the aim of our research was to determined NOS activity and zinc acetate action on enzyme activity in liver and brain cells under chronic alcoholic intoxication.

Male rats weighing 180-200 g were used in our research. They were fed a standard vivarium diet and tap water. The animals were divided into 3 groups. Group 1 was intact (control) animals; group 2 was rats with chronic alcoholic intoxication induced according to standard method (M.Kh. Khalilov, Sh.A. Zakirkhodzhaiev); group 3 was animals with chronic alcoholic intoxication zinc acetate administration (0.2 g/100 g). Liver and brain cells were isolated according to standard methods on 4, 7, 11, 16 and 21 day of pathology development. NOS activity was determined colorimetric.

It was established that NOS activity gradually increased in hepatocytes under chronic alcoholic intoxication. The maximum value was on 21 day (in 3.3 times in comparison with control). Zinc acetate treatment resulted in decrease of NOS activity in 1.7, 1.3, 1.6 times in comparison with group 2 on 7, 11 and 16 days respectively. But enzyme activity was increased in comparison with group 1 (in 2 times on 11 days, in 1.2 times on 21 days).

It is important to study of NO-synthase functioning in brain cells because NO is involved in processes of development of lesion and behavioral disorders under chronic alcoholic intoxication.

Development of chronic alcoholic intoxication was accompanied by gradual increase of NOS activity in brain cells with the highest level of activity on 21 day of the experiment (in 3.6 times in comparison with control). Zinc acetate administration provoked less enlargement of NOS activity in comparison with control (in 1.8; 2,3 and 1,3 times on 4, 11 and 21 days respectively) and reduction of NOS activity in 1.2, 1.7 and 2.7 times in comparison with group 2 only on 4, 16 and 21 day of experiment.

It is possible that increase of total NO-synthase activity in brain and liver cells was induced by enlargement of expression of inducible isoform of NOS. This isoform generates significantly larger amount of NO then endothelial or neuronal NOS. Accumulation of NO may cause of the factors of intensification toxic action of ethanol in these cells

So, we show that NOS activity gradual increased in observable organs under chronic alcohol intoxication. Enlargement of enzyme activity may provoke intensification of pathological damages. Zinc acetate treatment resulted in gradual decrease of NOS activity especially on the last stages of experiment. It is important that enzyme activity normalized in hepatocytes. These data indicate of possibility to use zinc acetate for correction of metabolic disorders induced by chronic ethanol administration.

ГЕПАТОЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВОГО ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДНОГО БЕТУЛИНА

Хисамутдинова Р.Ю., Басченко Н.Ж., Макара Н.С., Орлов А.В., Комиссарова Н.Г., Юнусов М.С.

Учреждение Российской академии наук Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия
e-mail: newpharm@anrb.ru

Пентациклические тритерпеноиды лупанового ряда относятся к классу доступных природных соединений с широким спектром биологической активности, в том числе и гепатопротекторной. Лечение заболеваний печени, вызванных инфекцией, токсическим действием химических веществ, пищевых аллергенов, алкоголя, побочным действием лекарств, до сих пор остается сложной задачей. Несмотря на большой ассортимент лекарственных препаратов, применяемых в комплексной терапии патологии печении, только единицы из них оказывают избирательное гепатопротекторное действие [1].

В данной работе изучена острая токсичность и гепатопротекторная активность одного из представителей новых производных бетулина (1), содержащих гетероциклический фрагмент. Установлено, что в отличие от бетулина (3 класс опасности) соединение (1) относится к веществам 4 класса опасности по ГОСТ 12.1.007-76. Гепатопротекторное действие изучено на модели острого токсического гепатита, вызванного у крыс тетрахлорметаном [2]. Ранее мы показали, что диникотинаты и гемифталаты бетулина обладают гепатозащитными свойствами при пероральном введении в дозах 12 - 20 мг/кг [3]. По аналогии соединение (1) вводили крысам внутрь в дозе 12 мг/кг ежедневно в течение 14 дней. В качестве препарата сравнения использовали карсил в той же дозе. Об эффективности действия соединения (1) судили по степени нормализации в крови трансаминаз АЛТ и АСТ, а также по влиянию на желчеобразовательную функцию печени. Установлено, что при экспериментальном поражении печени соединение (1) способствует снижению уровня АЛТ и АСТ в сыворотке крови в 1,5 раза по сравнению с нелеченными животными. В изученной дозе соединение (1) уступает карсилу по желчегонной активности, однако сочетание гепатопротекторной активности и низкой токсичности соединения создает предпосылки для его дальнейшего изучения в больших дозах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президиума РАН (Программа фундаментальных исследований № 7), гранта Президента РФ для ведущих научных школ (НШ-3756.2010.3) и гранта Президента РФ в поддержку молодых российских ученых (МК-7360.2010.3).

Литература:

1. Антиоксидантное и мембраностабилизирующее действие природных флавоноидов при остром экспериментальном тетрахлорметановом гепатозе. // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / Пятигорск: ГФА. - Пятигорск, 2005. - Вып.60. - С.336-338. (Соавт. Паукова Е.О., Агаджанян З.С., Саджая Л.А., Павлова Л. М).
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, Р.У. Хабриева (ред), Москва, 2005
3. *Карачурина Л.Т.* // Биохимические механизмы гепатопротекторного действия тритерпеноидов группы лупана и их фармакологическая активность.-. Диссертация на соискание ученой степени к.б.н. - Уфа - 2003.-201 с.

HEPATOPROTECTIVE ACTION OF NEW HETEROCYCLIC DERIVATIVE OF BETULIN

Khisamutdinova R.Y., Baschenko N.J., Makara N.S., Orlov A.V., Komissarova N.G., Yunusov M.S.

Institute of Organic Chemistry, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia, e-mail: newpharm@anrb.ru

Pentacyclic triterpenoids lupane series belong to the class of available natural compounds with a wide spectrum of biological activity, including hepatoprotective. Treatment of liver disease caused by infection, toxic effects of chemicals, food allergens, alcohol, side effects of drugs still remains a hard task to solve. Despite the wide range of drugs used in the treatment of liver disease, only a few of them produce a selective hepatoprotective effect [1].

The aim of this study was to investigate the acute toxicity and hepatoprotective activity of a representative of new derivatives of betulin (1), containing a heterocyclic fragment. The results showed that, in contrast to betulin (hazard class 3) compound (1) refers to the substance of hazard class 4 according to the State Standard 12.1.007-76. The hepatoprotective properties were investigated using a model of acute toxic hepatitis induced by carbon tetrachloride in rats [2]. Previously, it was shown that dinicotinate of betulin and bis(hemiphthalate) of betulin have hepatoprotective properties in per os doses 12 -20 mg/kg [3]. By analogy, compound (1) was given to rats per os in a dose of 12 mg/kg daily during a 14-day period. We used Carsil given in the same dose as a reference drug. We estimated the effect of compound (1) by the serum ALT and AST levels, as well as by the influence on choleopoetic liver function. It was found that in experimental liver injury compound (1) reduces the level of ALT and AST in blood serum in 1.5 times compared with untreated animals. Compound (1) in the studied dose showed less of choleretic effect than Carsil, but the combination of hepatoprotective effect and low toxicity of compound (1) suggest its further study in higher doses.

This work was supported by the Presidium of the Academy of Sciences (Basic Research Program number 7), a grant from the President of Russia for leading scientific schools (NSH-3756.2010.3) and grant of Russian Federation President in support of Young Russian Scientists (MK-7360.2010.3).

References:

1. *Al. Paukova E.O, Aghajanian Z.S, Sajaia L.A, Pavlova L.M.* // Antioxidant and membrane effects of natural flavonoids in acute experimental hepatitis induced by carbon tetrachloride. - Development, research and marketing of new pharmaceutical products: Sat. Scient. tr. / Pyatigorsk: FAU., 2005. - V.60. - S.336-338.
2. Guide to experimental (preclinical) study of new pharmacological agents, R.U Habrieva (ed.), Moscow, 2005
3. *Karachurina L.T* / / Biochemical mechanisms of hepatoprotective action of triterpenoids and their pharmacological activity .-. Thesis for the degree of Ph.D. - Ufa - 2003.-201 with.

О ПЕРСПЕКТИВАХ ПРИМЕНЕНИЯ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ РАСТЕНИЙ В МЕДИЦИНЕ

Хрипач В.А., Жабинский В.Н.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: khripach@iboch.bas-net.by

Роль стероидов в качестве гормонов позвоночных известна с первой половины прошлого века, а к середине 50-х годов стало очевидно, что стероиды также играют роль гормонов беспозвоночных, контролируя, в частности, процессы линьки у насекомых и других представителей семейства членистоногих. Приблизительно в это же время были обнаружены стероидные гормоны грибов. Открытие брассиностероидов, осуществляющих гормональные функции в растениях, показало, что стероиды являются универсальными гормональными регуляторами, присущими большинству организмов, населяющих планету Земля. Стероидные гормоны растений или брассиностероиды (БС) демонстрируют широкий спектр регуляторных эффектов в отношении роста и развития растений. Их характерной особенностью является способность повышать устойчивость растений к неблагоприятным факторам (стрессы, болезни, поллютанты и т.п.), а также увеличивать продуктивность наряду с улучшением качества урожая [1,2]. Существенно, что эти эффекты достигаются в результате применения исключительно малых доз гормонов, сравнимых с их естественным содержанием в растениях. Эти обстоятельства явились причиной интереса к БС в качестве новых экологически дружественных средств защиты и повышения урожайности растений. На основе наиболее активных представителей природных БС в нашей лаборатории разработан ряд препаратов для растениеводства, применяемых для обработки вегетирующих растений, семян, в составе минеральных удобрений, пестицидов и др. Действие БС связано с их эффектами на молекулярном и клеточном уровне, включающими активацию биосинтеза белков и нуклеиновых кислот, воздействие на гормональный баланс, активность ферментов, состав и свойства мембран. Как обязательные компоненты растений, БС вовлечены в пищевые цепи травоядных и других животных на протяжении всей совместной эволюции и по этой причине могут осуществлять определенные регуляторные функции за пределами растительного царства. Эти аспекты действия БС стали предметом изучения сравнительно недавно.

К настоящему времени нами получены многочисленные данные, характеризующие особенности действия БС у животных и обнаруживающие сходство защитно-стимулирующих эффектов БС в растительной и животной клетке как с точки зрения профилей активности, так и в отношении эффективных доз. Найденные свойства указывают на перспективность использования БС в качестве основы принципиально новых препаратов для практической медицины. Особый интерес в этой связи представляет открытое нами недавно антихолестеринемическое действие БС [3], а также их адаптогенная, иммуномодулирующая, противовирусная и противоопухолевая активность. В докладе будут освещено изучение этих и иных эффектов на различных моделях, а также представлены примеры реализации результатов исследований в разработках для медицины и ветеринарии.

Литература:

1. *V. A. Khripach, V. N. Zhabinskii, A. de Groot,* Brassinosteroids. A new class of plant hormones, San Diego, 1999, 456p.
2. *V.A. Khripach, V.N. Zhabinskii, N.B. Khripach.* New practical aspects of brassinosteroids and results of their ten-year agricultural use in Russia and Belarus. In “Brassinosteroids. Bioactivity and Crop Productivity”, Ed. S. Hayat, A. Ahmad, Kluwer Academic Publisher, 2003, p. 189-230.
3. Method for decreasing cholesterol level in blood, Pat. US 6,998,397, 2006.

ON THE PROSPECTS OF STEROIDAL PLANT HORMONES FOR MEDICAL USE

Khripach V.A., Zhabinskii V.N.

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: khripach@iboch.bas-net.by

Steroids have been recognized as the hormones of higher vertebrates in the first half of the last century. In the beginning of its second half it became evident that steroids play a hormonal role in invertebrates also, in particular in the molting functions of insects and other arthropods. At about the same time steroid hormones of fungi were found. Discovery of brassinosteroids (BS) having hormonal functions in plants showed that steroids are versatile hormonal regulators, characteristic to most organisms inhabiting the Earth. BS demonstrate wide spectrum of regulatory effects on plant growth and development. Their important feature is the ability to enhance plant resistance to unfavorable factors (diseases, stresses, pollutants, etc.) and to improve plant productivity together with the quality of crops [1,2]. This can be reached by application of very low doses, which are comparable with natural BS content in plants. All these are the reasons why BS become popular compounds for environmentally friendly approaches to plant protection and increasing crop yields. A number of new agrochemicals based on the most active natural BS as active ingredients have been developed in our laboratory. BS protective action is a result of multiple changes at molecular and cell level including activation of protein and nucleic acids' biosynthesis, changes in hormonal balance, activity of enzymes, in composition and properties of membranes. As obligatory constituents of plants, BS have been and are consumed by herbivores with food over all the evolution and in this way could play certain regulatory role outside plant kingdom. These aspects of BS activity became the subject of investigations only recently.

By now, we obtained multiple data that characterize specific activities of BS in animals and disclose their similarity to a certain extent with the effects of BS in plant cells both in respect to activity profiles and efficient doses. The discovered properties show that BS are promising as basic active substances of new drugs for medicine. In this respect, recently discovered by us anticholesterolemic activity [3] is one of the most interesting effects as well as adaptogenic, immunomodulating, antiviral and anticancer properties of BS. Data on investigations of these and some other effects in different experimental models and examples of practical realization of the results in medicine and veterinary will be discussed.

References:

1. *V. A. Khripach, V. N. Zhabinskii, A. de Groot,* Brassinosteroids. A new class of plant hormones, San Diego, 1999, 456p.
2. *V.A. Khripach, V.N. Zhabinskii, N.B. Khripach.* New practical aspects of brassinosteroids and results of their ten-year agricultural use in Russia and Belarus. In "Brassinosteroids. Bioactivity and Crop Productivity", Ed. S. Hayat, A. Ahmad, Kluwer Academic Publisher, 2003, p. 189-230.
3. Method for decreasing cholesterol level in blood, Pat. US 6,998,397, 2006.

ОСОБЛИВОСТІ ДІЇ ІНГІБІТОРА НАТРІЄВОЇ ПОМПИ КАЛІКСАРЕНУ С107 НА СКОРОТЛИВУ АКТИВНІСТЬ ІНТЕСТИНАЛЬНИХ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ ТА Na^+,K^+-АТФ-АЗУ ГЕПАТОЦИТІВ В УМОВАХ *IN VIVO*

[1]Цимбалюк О.В., [2]Костерін С.О.

[1]Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна. e-mail: otsimbal@univ.kiev.ua,
[2]Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, Україна. e-mail: kinet@biochem.kiev.ua

Каліксарени – це клас макроциклічних сполук, які одержують прецизійною циклоконденсацією пара-заміщених фенолів і формальдегіду [1]. У останні роки цим речовинам приділяється особлива увага, оскільки вони володіють здатністю специфічно розпізнавати іони, модифікувати ферментативні та іон-транспортні системи клітин. Так, зокрема, деякі каліксарени (сполуки з шифрами С97, С99 і С107) в умовах *in vitro* здатні пригнічувати активність Na^+,K^+-АТФ-ази плазматичної мембрани більш ефективно, порівняно з класичним інгібітором уабаїном. Також для цих каліксаренів встановлена здатність модифікувати скоротливу активність гладеньких м'язів кишечнику.

Для вивчення особливостей дії каліксаренів в умовах цілісного організму було досліджено ефект хронічного ін'єктування щурам каліксарену С107 та його структурного фрагменту М3 (не володіє здатністю інгібувати Na^+,K^+-АТФ-азу). Паралельно, в аналогічних умовах досліджували хронічну дію уабаїну. В подальшому вивчали функціонування інтестинальних гладеньких м'язів та перевіряли активність Na^+,K^+-АТФ-ази плазматичної мембрани гепатоцитів. Скорочення гладеньком'язових смужок кільцевих м'язів сліпої кишки caecum щурів індукували K^+-деполяризацією (ГКР, 80 мМ) і ацетилхоліном (10 мкМ) та реєстрували в ізометричному режимі. Оскільки в роботі передбачався аналіз скоротливих відповідей гладеньком'язових препаратів, одержаних з різних тварин, у якості об'єктивних критеріїв їх порівняння було обрано показники нормованих максимальних швидкостей фаз скорочення (V_{nc}) та розслаблення (V_{nr}) відповідно до методу [2].

Було встановлено, що каліксарен С107, як і уабаїн, в умовах цілісного організму зберігає здатність інгібувати Na^+,K^+-АТФ-азу фракції плазматичних мембран гепатоцитів. Крім блокування натрієвої помпи каліксарен зумовлює значне (в два рази) зниження загальної АТФ-азної активності цих препаратів. Фрагмент М3, який не виявляв ефективності щодо натрієвої помпи в експериментах *in vitro*, також не змінював ензиматичної активності в умовах *in vivo*.

В умовах хронічного впливу каліксарен С107 та його фрагмент М3 переважно (крім V_{nc} K^+-викликаних скорочень) не впливав на показники нормованих максимальних швидкостей фази скорочення ГКР- і АХ-викликаних скорочень, але ефективно зменшував V_{nr} (див. рис.). Напротивагу С107, класичний інгібітор натрієвої помпи уабаїн не справляв жодного впливу на швидкісні характеристики скоротливих відповідей гладеньком'язових препаратів caecum. Такі результати в умовах хронічної дії речовин *in vivo* переважно відтворюють тенденції змін скорочувальної функції caecum при їх аплікуванні *in vitro*.

Отже, каліксарен С107 зберігає свої властивості в умовах цілісного організму, тому може мати перспективи при створенні фармакологічних засобів, спрямованих на модулювання порушень, пов'язаних з гіперекспресією натрієвої помпи.

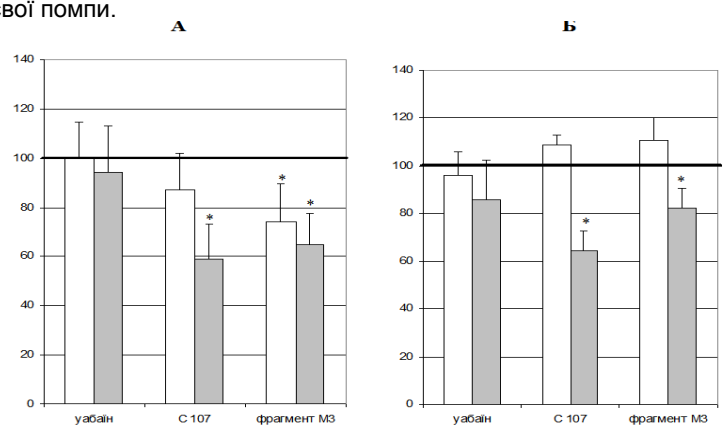


Рис. Вплив уабаїну, каліксарену С107 та його фрагменту М3 в умовах *in vivo* на механокінетичні параметри викликаних гіперкалієвим розчином (А) та ацетилхоліном (Б) скорочень гладеньком'язових препаратів caecum щура: білі стовпці - максимальна нормована швидкість фази скорочення (V_{nc}), сірі стовпці – фази розслаблення (V_{nr}) (M±m, n=6). За 100 % були прийняті контрольні значення відповідних параметрів.

Автори вдячні член-кор. НАНУ проф. В.І.Кальченку та його колегам (ІОХ НАНУ) за синтез та люб'язне надання препаратів каліксаренів.

Література:

1. *Gutsche C.D.* Calixarenes Revisited, The Royal Society of Chemistry: Cambridge (1998).
2. *Burdyga Th.V., Kosterin S.A.* Kinetic analisis of smooth muscle relaxation. // Gen. Physiol. Biophys. 1991. №10. P. 589–598.

THE INFLUENCE OF THE SODIUM PUMP INHIBITOR CALIXSARENE C107 ON THE CONTRACTILE ACTIVITY OF INTESTINAL SMOOTH MUSCLES AND NA^+,K^+-ATP-ASE ACTIVITY OF HEPATOCYTES UNDER THE CONDITIONS *IN VIVO*

[1]Tsymbalyuk O.V., [2]Kosterin S.O.

[1]Kyiv national Taras Shevchenko university, Kyiv, Ukraine. e-mail: otsimbal@univ.kiev.ua,
[2]Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine e-mail: kinet@biochem.kiev.ua

The calixsarenes - is the class of macrocyclic compounds, which synthesize via precision cyclocondensation the para-substituted phenols and formaldehyde [1]. In recent years the special attention is inverted to calixsarenes, because they are capable of specifically recognizing ions, of modifying the cell fermentative and ion-transport systems. In particular, some of them (there codes are C97, C99 and C107) under the conditions *in vitro* suppress of Na^+,K^+-ATP-ase activity more effectively than classical inhibitor ouabain. Also these substances change the contractile activity of the preparations of intestinal smooth muscles.

The effect of chronic injection to the rats of calixarene C107 and its structural part (M3 fragment, it did not influence Na^+,K^+-ATP-ase activity) it was investigated for studying the special features of the influence of this calixsarenes under the conditions of the complete organism. Chronic influence of ouabain was studied under the analogical conditions. The functioning of intestinal smooth muscles and the activity of the sodium pump of the hepatocytes further were studied. The smooth muscles contractions were induced with K^+-depolarization (HPS, 80 mM) and acetylcholine (10 μM) and were recorded under the isometric conditions. Accordingly method of the kinetic analysis [2] the normalized maximal rate separately of the contraction and relaxation phases (V_{nc} and V_{nr}, respectively) of contracting answers were determined, which makes it possible to objectively compare the contractions of the muscles, obtained from different animals.

It is established that under the conditions *in vivo* calixarene C107 as ouabain, preserves the ability to suppress Na^+,K^+-ATPase of the plasmatic membrane of rat hepatocytes. Also, calixarene C107 considerably (twice) decreased the general ATP-ase activity of these preparations (see fig.). The M3 fragment did not change fermentative activity under the conditions *in vivo* as *in vitro*.

Calixarene C107 and its component M3 practically (besides V_{nc} of HPS-evoked contractions in the presence of M3) did not influence the speed of contraction phase under the conditions *in vivo*. It is shown that in these conditions ouabain does not change the kinetic parameters of contractile answers. Unlike ouabain, calixarene C107 and its structural fragment M3 caused effective V_{nr} declining. Such tendencies of velocity change mainly repeat the dependences, obtained under the conditions *in vitro*.

Thus, calixarene C107 preserves its properties under the conditions of the complete organism; therefore it can serve as the basis of the creation of the pharmacological preparations, which block sodium pump with its hyper-expression.

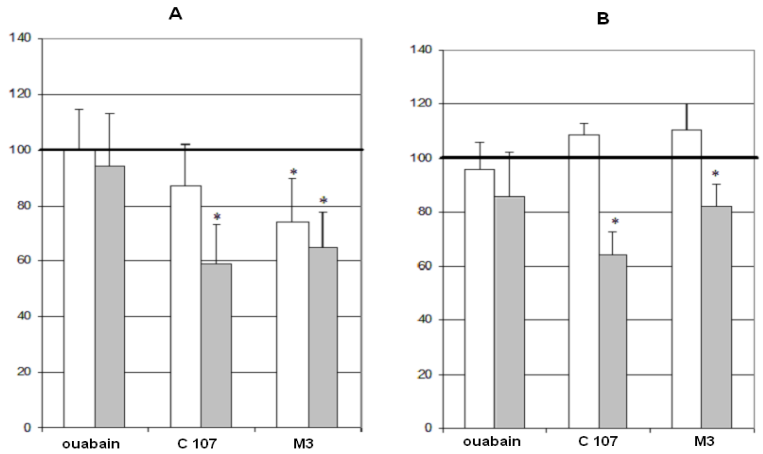


Fig. The influence of ouabain, calixarene C107 and its structural part M3 under the condition *in vivo* on the mechanokinetical parameters K^+-depolarization- (A) and acetylcholine-evoked (B) contractions of rat caecum smooth muscle strips: white column - normalized maximal rate of the contraction phase (V_{nc}), gray column – of the relaxation phase (V_{nr}) (M±m, n=6). Data presented in % relative to control values that was accepted as 100%,

Authors thank corresponding member NASU, prof. V.I.Kalchenko and his colleagues (Institute of Organic Chemistry of NASU) for the synthesis and the amiable provision of calixarenes.

References:

1. *Gutsche C.D.* Calixarenes Revisited, The Royal Society of Chemistry: Cambridge (1998).
2. *Burdyga Th.V., Kosterin S.A.* Kinetic analisis of smooth muscle relaxation. // Gen. Physiol. Biophys. 1991. №10. P. 589–598.

ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ НОВОГО КОМПЛЕКСУ ПАЛАДІЮ З ОКСИЕТИЛІДЕНДИФОСФОНОВОЮ КИСЛОТОЮ

[1]Чехун В.Ф., [2]Пехньо В.І., [2]Козачкова О.М., [2]Царик Н.В., [1]Тодор І.М., [1]Шпильова С.І.

[1]Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім.Р.Є.Кавецького НАН України, Київ, Україна
e-mail: oncom@onconet.kiev.ua
[2]Інститут загальної та неорганічної хімії ім.Вернадського НАН України, Київ, Україна

Останнім часом проводиться широкий пошук нових протипухлинних препаратів з більшою селективністю та ефективністю і меншою токсичністю, ніж відомі препарати на основі цис-$Pt(NH_3)_2Cl_2$.Одним з раціональних шляхів створення біологічно активних комплексів є приєднання металу платинової групи до структури, яка б була зручною транспортною формою для цитотоксичної групи. З цієї точки зору цікавими є комплекси платинових металів з фосфоновими кислотами. Нами були синтезовані комплекси платинових металів з оксиетилідендифосфоновою кислотою та досліджена їх протипухлинна активність.

Встановлено, що при взаємодії K_2PdCl_4 та цис-$Pd(NH_3)_2Cl_2$ з ОЕДФ в розчинах без введення сторонніх електролітів та при фізіологічній концентрації хлорид-іонів (0,15 моль/л) утворюються комплекси з співвідношенням метал-ліганд=1:1, в яких до координаційної сфери паладію(II) входять два атоми кисню фосфонових груп ОЕДФ та два хлорид-іони або дві молекули NH_3.

Встановлено, що за протипухлинною активністю in vivo у тварин з карциномою мишей Ерліха нова сполука паладію K_2PdCl_4:ОЕДФ не відрізнялася від цисплатини. Поряд з цим, K_2PdCl_4:ОЕДФ (1:1) гальмував ріст та метастазування карциноми легені Льюїс на 41% та 43%, відповідно, та пригнічував ріст та метастазування меланоми В-16 на 39% та 47%, відповідно. Також встановлено, що нефротоксичність K_2PdCl_4:ОЕДФ (1:1) значно менша за цисплатину, навіть в дозі вищій за цисплатину у 20 разів. Виявлено, що паладій у комплексній системі K_2PdCl_4:ОЕДФ (1:1) затримується в кістках хребта і практично не виводиться з них на протязі 10 діб після введення препарату.

Таким чином, цитотоксична активність комплекса паладію з оксиетилідендифосфоновою кислотою не менша за цитотоксичну активність цисплатини. Комплекс паладію з ОЕДФ проявляє меншу нефротоксичність, ніж референтна сполука цисплатина. Комплекс паладію з ОЕДФ, на відміну від цисплатини, може накопичуватись у кістках, що є дуже актуальним при лікуванні хворих з пухлинами кісткової тканини та метастазами у кістки. Результати біологічних випробувань комплексу паладію(II) з ОЕДФ свідчать про перспективність використання біфосфонатів в якості лігандів для створення нових протипухлинних препаратів на основі паладію(II).

Робота підтримана договором № 5.16.3.19/10 Державної цільової науково-технічної програми «Нанотехнології та наноматеріали» на 2010-2014 роки»

ANTITUMOR ACTIVITY OF THE NEW PALLADIUM COMPLEX WITH HYDROXYETHYLIDENBIPHOSPHONIC ACID

[1]Chekhun V.F., [2]Pekhnyo V.I., [2]Kozachkova O.M., [2]Tsaryk N.V., [1]Todor I.M., [1]Shpylyova S.I.

[1]R.E.Kavetsky Institute of experimental pathology, oncology and radiobiology of NAS, Kyiv, Ukraine
e-mail: oncom@onconet.kiev.ua
[2]Vernadsky Institute of general and inorganic chemistry of NAS, Kyiv, Ukraine.

Lately a wide search of new antitumor preparations with higher selectivity and efficiency and lower toxicity than of those known today, has been done. One of the reasonable ways of creating biologically active complexes is attaching metals of the platinum group to the structure, which would be a convenient transporting form for a cytotoxic group. From this perspective, complexes of platinum metals with phosphonic acids are of great interest. We have synthesized complexes of platinum metals with hydroxyethylidenbiphosphonic acid (HEBP) and investigated their antitumor activity.

It was determined that during interaction between K_2PdCl_4 and cis-$Pd(NH_3)_2Cl_2$ with HEBP in solutions without extraneous electrolytes and in physiologic concentration of chloride ions(0.15 mol/l) complexes with metal-ligand=1:1 proportion, which contain two oxygen atoms of phosphonic groups of HEBP and two chloride ions or two NH_3 molecules in Pd(II) coordination sphere, are formed.

It was determined that new palladium substance K_2PdCl_4–HEBP didn't differ from cisplatin in antitumor activity in vivo of animals with Ehrlich mice carcinoma. Herewith, K_2PdCl_4:HEBP(1:1) was slowing the growth and the Lewis lung carcinoma metastasis of 41% and 43%, respectively, and inhibiting the growth and the melanoma B-16 metastasis of 39% and 47%, respectively. It was also determined that K_2PdCl_4:HEBP(1:1) nephrotoxicity is much lower than the cisplatin one, even in the dose 20 times higher than cisplatin. It was defined that palladium in complex system K_2PdCl_4:HEBP(1:1) deposits in spinal bones and virtually doesn't excrete out of them in 10 days after preparation injection.

Thereby, cytotoxic activity of palladium-hydroxyethylidenbiphosphonic acid complex is no less than the cisplatin one. Palladium–HEBP complex shows lower nephrotoxicity than reference substance cisplatin. Palladium–HEBP complex, unlike cisplatin, can accumulate in bones which is very urgent in the treatment of patients with bone tissue tumors and bone metastases. The results of palladium(II)–HEBP complex biological tests argue about the perspective of using biphosphonates as ligands for the creation of new preparations on the palladium(II) base.

Work is backed with a deal № 5.16.3.19/10 of the State Objective Scientific and Technical Program "Nanotechnologies and nanomaterials" for 2010-2014.

ВКЛАД РАЗЛИЧНЫХ НЕЙРОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ В РАЗВИТИЕ АНТИНОЦИЦЕПТИВНОГО ЭФФЕКТА НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭМИ КВЧ

Чуян Е.Н., Джелдубаева Е.Р.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
e-mail: delviza@mail.ru

Исследования механизмов антиноцицептивного действия низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ) (7,1 мм, 0,1 мВт/см^2) при экспериментально вызванной тонической боли в «формалиновом тесте» (ФТ) у крыс продемонстрировали важную роль в аналгетическом действии этого физического фактора опиодных пептидов (ОпП), серотонина (СТ), дофамин- (ДА), норадренергических (НА) систем и мелатонина (МТ). Так, сравнительный анализ аналгетической эффективности (АЭ) воздействия ЭМИ КВЧ в ФТ на фоне предварительного введения фармакологических препаратов, а именно налоксона (блокатора всех субтипов рецепторов ОпП), парахлорфенилаланина (ингибитора синтеза СТ), пропранолола (β-адреноблокатора), ницерголина (α-адреноблокатора), галоперидола (блокатора ДА-новых рецепторов) и лузиндола (блокатора МТ-новых рецепторов) свидетельствует о том, что в зависимости от времени протекания болевой реакции механизмы аналгетического эффекта КВЧ-воздействия, по-видимому, обеспечиваются различными нейрохимическими эндогенными системами.

Показано, что дополнительное введение изученных препаратов вызвало в той или иной степени уменьшение АЭ ЭМИ КВЧ: при ингибировании синтеза СТ (на 47,97 %; $p<0,001$); при блокировании ОпР (на 19,13 %), МТ- (на 28,99 %) и α-адренорецепторов (на 30,26 %). При блокаде ДА-вых и β-адренергических рецепторов АЭ ЭМИ КВЧ имела лишь тенденцию к уменьшению.

Причем, при введении одних блокаторов в большей степени снижалась АЭ ЭМИ КВЧ в первой острой фазе болевого стресса, других – во второй тонической. Так, практически полное нивелирование антиноцицептивного эффекта КВЧ-воздействия первой фазы болевой реакции отмечалось при дополнительном введении блокаторов рецепторов ОпП и МТ (АЭ ЭМИ КВЧ уменьшилась на 73,00 %; $p<0,001$ и 70,82 %; $p<0,001$ соответственно). Минимальное влияние на протекание первой фазы болевой реакции отмечалось при блокировании ДА-овых рецепторов и ингибировании синтеза СТ (АЭ уменьшилась на 30,02 %; $p<0,001$ и 20,71 %; $p<0,001$ соответственно).

Максимальное уменьшение АЭ ЭМИ КВЧ при протекании второй тонической фазы болевой реакции отмечено при ингибировании синтеза СТ (на 50,15 %; $p<0,001$), а также блокировании МТ-вых (на 19,93 %; $p<0,01$) и α-адреналовых (на 22,50 %; $p<0,01$) рецепторов.

Следовательно, все изученные эндогенные нейрохимические системы в той или иной степени участвуют в механизмах антиноцицептивного действия ЭМИ КВЧ. Как показали результаты проведенного исследования, в ранней фазе болевого стресса ведущую роль в механизмах обезболивающего действия ЭМИ КВЧ играют эндогенные ОпП, МТ и НА, а во второй фазе – СТ.

CONTRIBUTION OF DIFFERENT NEUROCHEMICAL SYSTEMS TO THE DEVELOPMENT OF ANTINOCICEPTIVE EFFECTS OF LOW EHF EMR

Chuyan E.N., Dzheldubaeva E.R.

Taurida National V.I.Vernadsky University, Simferopol, Ukraine
e-mail: delviza@mail.ru

Studying the mechanisms of antinociceptive action of low-intensity electromagnetic radiation of extremely high frequency (EHF EMR) (7,1 mm, 0,1 mW / cm 2) under the conditions of experimentally induced tonic pain during the “formalin test” (FT) in rats has demonstrated an important role in the analgesic action of this physical factor of opioid peptides (OP), serotonin (ST), dopamine-(DA), noradrenergic (NA) systems and melatonin (MT).

Thus, the comparative analysis of the analgesic effectiveness (AE) of EHF EMR impact in the FT against the background of the preliminary administration of pharmaceutical preparations, namely, naloxone (blocker of all subtypes of OP receptors), parahlorfenilalanin (ST synthesis inhibitor), propranolol

(β- adrenoreceptor blocking agent), nicergoline (α-adrenergic receptors blocker), haloperidol (blocker of DA receptors) and luzindola (MT-receptors blocker) suggests that, depending on the time course of pain reaction, mechanisms of the analgesic effect of EHF therapy, apparently, are provided by various endogenous neurochemical systems.

It is shown that the additional introduction of the studied drugs caused a greater or lesser degree of decrease in the AE of EHF EMR: while inhibition of synthesis of ST (by 47.97%, p <0,001), while blocking of the OP - (by 19.13%), MT- (by 28, 99%) and α-adrenergic receptors (by 30.26%). While the blockade of the DA and β-adrenergic receptors AE EHF EMR had the only a tendency to decrease.

Moreover, the introduction of some blockers largely decreased the AE of EHF EMR in the first acute phase of pain stress, and others - during the second tonic. Thus, almost complete leveling of the antinociceptive effect of EHF therapy of the first phase of pain response was noted in the introduction of an additional OP receptor blockers and MT (AE EHF EMR has decreased by 73.00%, p <0.001 and 70.82%,

p <0.001, respectively). Minimal impact on the course of the first phase of pain response was noted in blocking DA receptors and inhibition of the synthesis of ST (AE decreased by 30.02%, p <0.001 and 20.71%, p <0.001, respectively).

The maximum reduction of the AE of EHF EMR during the flow of the second tonic phase of pain reaction observed while the inhibition of the synthesis of ST (by 50.15%, p <0,001), as well as blocking of MT (by 19.93%, p <0,01) and α -adrenal (by 22.50%, p <0.01) receptors.

Consequently, all the studied endogenous neurochemical systems to one extent or another are involved in the mechanisms of antinociceptive action of EHF EMR. As the results of the conducted research showed, in the early phase of painful stress the leading role in the mechanisms of the analgesic action of EHF EMR play endogenous OP, MT and NA, while the second phase - ST.

РЕАКЦИИ МИКРОСОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ НА ИОНОФОРЕТИЧЕСКОЕ ВВЕДЕНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА И НИТРОПРУССИДА В УСЛОВИЯХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАЙНЕ ВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ

Чуян Е.Н., Раваева М.Ю., Трибрат Н.С.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
e-mail: mravaeva@ukr.net

Методом лазерной допплеровской флоуметрии у 70 студентов-волонтеров женского пола в возрасте 21-23 года исследовались микроциркуляторные процессы в условиях ежедневного 10-тикратного воздействия низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ) в течение 30 минут на область биологически активной точки GI-4 правой руки.

Реакции микрососудистого эндотелия на ионофоретическое введение ацетилхолина хлорида (АХ) и нитропруссида нартрия (НП) исследовали с использованием фармакологической пробы, которую проводили до воздействия ЭМИ КВЧ, а также сразу после окончания первого, пятого и десятого сеансов мм-излучения с помощью прибора для проведения функциональных проб «ЛАКК-ТЕСТ» (Россия, «Лазма») с использованием ионофоретического пробника по следующей схеме: регистрация исходного уровня тканевого кровотока в течение 1-ой минуты → регистрация кровотока во время проведения ионофореза 1% раствором АХ в течение 3-ех минут при силе тока 5 мкА → регистрация динамики перфузии в период восстановления после ионофореза в течение 6-ти минут. По аналогичной схеме проводили фармакологическую пробу с 1% раствором НП.

При курсовом действии мм-излучения наблюдалось увеличение функциональной активности микрососудистого эндотелия. При этом, после первого, пятого и десятого сеансов КВЧ-воздействия происходил рост уровня функциональной активность эндотелия (ФАЭ) на 48,39% ($p \leq 0,05$), 78,76% ($p \leq 0,05$) и 63,98% ($p \leq 0,05$) соответственно. Кроме того, уже в период восстановления после первого сеанса КВЧ-воздействия отмечалось увеличение амплитуд эндотелиальных ритмов Аэ(АХ/НП) на 35,20% ($p \leq 0,05$). После пятого и десятого сеансов воздействия низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ отмечался прирост данного показателя, как в период проведения ионофореза, так и в период восстановления максимально на 51,71% ($p \leq 0,05$) и 33,94% ($p \leq 0,05$) соответственно. Об этом свидетельствует увеличение резерва капиллярного кровотока (РКК) при ионофорезе АХ после пятого и десятого сеансов воздействия ЭМИ КВЧ на 41,55% ($p \leq 0,05$) и 37,95% ($p \leq 0,05$) соответственно относительно фоновых значений данного показателя. Однако динамика показателя РКК(НП) и Аэ(НП) при действии мм-излучения характеризовалась лишь незначительной тенденцией к росту.

Таким образом, низкоинтенсивное ЭМИ КВЧ способствует увеличению показателей Аэ(АХ), РКК(АХ) и ФАЭ, характеризующих функциональную активность эндотелия, причем реакция на действие АХ была более выраженная, чем на НП. Поскольку известно, что АХ вызывает активацию ферментных систем, локализованных в эндотелии, способствуя высвобождению NO эндотелиоцитами, который, воздействуя на гладкомышечные клетки сосудов, приводит к вазодилатации и увеличению потока крови. В то же время реакция на НП как донор NO отражает релаксацию сосудов, вызванную непосредственным действием препарата на гладкую мускулатуру. Следовательно, отмечаемое прогрессирующее увеличение показателей ФАЭ и Аэ(АХ/НП), а также Аэ(АХ), РКК(АХ) и при курсовом воздействии мм-излучения свидетельствует об увеличении активности микрососудистого эндотелия, что проявилось в увеличении генерации NO в ответ на КВЧ-воздействие. Подтверждением этому является снижение содержания нитрит-аниона на 53,8 % ($p \leq 0,05$) при значительном повышении активности конституционного de novo синтеза NO (активности cNOS) на 426 % ($p \leq 0,05$) в плазме крови студентов-волонтеров после 10-тикратного КВЧ-воздействия.

Таким образом, ионофоретическое введение ацетилхолина и нитропруссида позволило установить, что при действии ЭМИ КВЧ происходит увеличение функциональной активности сосудистого эндотелия за счет активации NO-зависимых процессов.

RESPONSE OF MICROVASCULAR ENDOTHELIUM TO IONOFORETIC INTRODUCTION OF ACETYLCHOLINE AND NITROPRUSSIDE IN ELECTROMAGNETIC RADIATION OF EXTREMELY HIGH FREQUENCY

Chuyan E.N., Tribrat N.S., Ravaeva M.Y.

Taurida National Vernadsky University, Simferopol, Ukraine,
e-mail: mravaeva@ukr.net

Processes of microcirculatory were investigated by the method of laser Doppler flowmetry. 70 volunteer-students were involved in research. They were females, aged 21-23 years. Girls were daily exposed to 10-fold effect of low-intensity electromagnetic radiation of extremely high frequency (EHF EHF). Impact as performed on the area of biologically active points (BAP) right hand - GI-4 during 30-minutes.

Reaction of microvascular endothelium to ionoforetic introduction was investigated using pharmacological test with acetylcholine chloride (ACh) and nitroprusside (NP). Pharmacological test had been conducted befor the action of EHF EHF and after the first, fifth and tenth sessions of influence EMR EHF using device for functional tests - "LACK-TEST" (Russia, „Lazma”), wich includes ionoforetic applicator. Registration of the parameters of microcirculatory is performed as follows: registration of initial level of tissue blood flow whithout any application during for 1 minutes→ registration of parameters of blood flow during iontophoresis application of 1% solution of ACh for→ registration parameters of blood flow during 3 minutes at a current of 5 mkA→ registration of dynamics of perfusion in the recovery period after iontophoresis during 6 minutes. A similar scheme of pharmacological test with a 1% solution of NP was carried out.

Increase of functional activity of microvascular endothelium occurd in exchange exposure EMR EHF. In this case a growing level of functional activity of endothelial (FAE) at 48,39% ($p \leq 0,05$), 78,76% ($p \leq 0,05$) and 63,98 % ($p \leq 0,05$), after the first, fifth and tenth sessions of EHF-therapy respectively took place. In already, even in the recovery period the first session of EHF-therapy showed an increase of the amplitudes of endothelial rhythms Ae (ACh / NP) to 35,20% ($p \leq 0,05$). The fifth and tenth sessions of the impact of low-intensity EHF EMR marked increase in this indicator, as during the iontophoresis and in the recovery period a maximum of 51,71% ($p \leq 0,05$) and 33,94% ($p \leq 0,05$) respectively. This is proved by increase in capillary blood flow reserve (BFR) for iontophoresis ACh after the fifth and tenth sessions of exposure to EHF EMR 41,55% ($p \leq 0,05$) and 37,95% ($p \leq 0,05$), respectively relative to background values of indicator. However, the dynamics in the BFR (NP) and Ae (NP) under the action of EMR EHF characterized by small upward trend.

Thus, low-intensity EHF EMR increases the performance Ae (ACh), BFR (ACh) and FAE, characterizing the functional activity to the endothelium, and the reaction for the ACh was more intensive in compaticon than to NP. Since it is known, that ACh is the activation of enzyme systems localized in the endothelium, contributing to the release of endothelial NO, which, affecting smooth muscle cells of blood vessels, leads to vasodilation and increased blood flow. At the same time, the reaction to the NP as a donor of NO reflects relaxation of blood vessels caused by the direct effect of the drug on smooth muscles. Consequently, a noted progressive increase in performance FAE and Ae (ACh/NP) and Ae (ACh), BFR (ACh) and exchanged rate effects of millimeter radiation indicates an increased activity of microvascular endothelium, which showed an increase in NO generation in response to the EHF-effect. As the acknowledgement of it is the decrease of the content of nitrite-aniona by 53,8 % ($p \leq 0,05$) at the substantial increase of activity of constitutional de novo synthesis NO (activity cNOS) by 426 % ($p \leq 0,05$) in plasma of blood of students-volunteers after 10-fold effect of low-intensity electromagnetic radiation.

Thus, ionoforetic introduction of ACh and NP revealed that the influence of EHF EMR increases the functional activity of vascular endothelium by activation of NO-dependent processes.

N-АЦЕТИЛ-L-КАРНИТИН И Mg-ТАУРИН АКТИВИРУЮТ ВЫЗВАННОЕ СТАРОСТЬЮ СНИЖЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДЫХАНИЯ МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ И МОЗГА

Шафрановская Е.В., Абдо М.

Институт фармакологии и биохимии НАН БеларусиБ Минск, Беларусь
e-mail: farmacia@it.org.by

С возрастом в клетке снижается интенсивность биоэнергетических процессов, ключевым звеном патологического процесса является нарушение работы дыхательной цепи митохондрий. Количество производимой ими энергии падает. Применение ряда веществ может усиливать активности дегидрогеназ и оксидаз дыхательной цепи митохондрий. К таким препаратам могут относиться N-Ацетил-L-Карнитин и Mg-Таурин.

N-ацетил-L-карнитин (АЛК) выполняет важную функцию в организме человека. Он переносит остатки жирных кислот из цитоплазмы в митохондрии, обеспечивая запас субстрата для образования энергии, которая необходима для функционирования всех клеток, тканей и систем организма. Таурин относят к серусодержащим аминокислотам. Он оказывает гиполипидемическое и гипохолестеринемическое действие, активирует реакции всасывания и утилизации липидов и холестерина. Цель нашей работы - исследовать действие выбранных аминокислот in vivo на митохондриальную функцию печени и мозга старых животных.

В опыты брали крыс-самок линии WAG в возрасте 2-х лет, содержащихся на стандартном рационе вивария Института фармакологии и биохимии НАН Беларуси. Животных распределили на 4 группы по 5 особей. В первой группе содержались крысы, получавшие внутрибрюшинно физраствор. Вторая группа получала N-ацетил-L-карнитин в дозе 200 мг/кг, третья группа – Mg-T в дозе 10 мг/кг и четвертая - N-ацетил-L-карнитин и Mg-T в соответствующих дозах. Введение препаратов проводили ежедневно в течение 4-х суток.

Процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях печени и головного мозга изучали по стандартной методике. После декапитации из печеночной и мозговой ткани методом дифференциального центрифугирования выделяли митохондрии. Проводили измерение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ). Полярографически, с помощью закрытого электрода Кларка и ТРР - селективного электрода (Record 4usb, Россия), определяли состояние окислительного фосфорилирования и мембранного потенциала митохондрий. В качестве субстрата окисления использовали сукцинат. По данным полярограммы рассчитывали скорость дыхания митохондрий в различных метаболических состояниях (V_0 – скорость окисления субстрата, V_3 – скорость фосфорилирующего окисления, V_4 – скорость окисления после фосфорилирования). Также рассчитывали показатели, характеризующие сопряжение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях: дыхательный контроль по Чансу и Уильямсу ($ДК_{чу}$ $=V_3/V_4$), коэффициент АДФ/О. Скорости дыхания митохондрий выражали в наног-атомах O_2 за 1мин в расчете на 1 мг белка митохондрий. Полученные данные обрабатывали с помощью пакета Statistica 6.0 с подсчетом критерия Стьюдента для непарных выборок. Данные считались достоверными при $p < 0.05$.

Обеспечение сукцинатдегидрогеназой введения электронов в дыхательную цепь, минуя НАД и первый пункт сопряжения, и осуществление переноса электронов по ней при увеличении возраста организма снижается. Действие АЛК и Mg-T вызывало рост активности СДГ в митохондриях печени и мозга, причем эффект Mg-T был выше на 25% относительно АЛК. Сочетание обеих аминокислот проявляло признаки аддитивности и увеличивало активность СДГ относительно контроля на 110%. Исследования показали, что интенсивность потребления кислорода митохондриями старых животных невысока и скорость V_3 не преобладает над скоростью дефосфорилирования V_4. Увеличенная скорость дыхания V_4 у старых крыс свидетельствует о нарушении внутренних мембран митохондрий. При этом утечка ионов через мембрану снимает мембранный потенциал. Мембранный потенциал ($\Delta\Psi$) после добавления субстратов дыхания у старых крыс незначительно возрастает, но затем быстро спонтанно падает. В экспериментальных группах сохраняется незначительное повышение мембранного потенциала после добавления АДФ.

Изучение скоростей дыхания митохондрий печени старых крыс показало, что АЛК, Mg-T и АЛК + Mg-T повышают окислительное фосфорилирование (V_3) на 23%, 30%, 18% соответственно. Скорость окисления после фосфорилирования (V_4) снижается при действии Mg-T и сочетании аминокислот, изменения под влиянием АЛК недостоверны. Полученные параметры дыхательного контроля свидетельствуют о положительном влиянии исследуемых аминокислот (увеличиние от 0,65 в контроле до 1,3 -2,0 в экспериментальных группах) на субстрате комплекса II.

Митохондрии мозга под действием АЛК не изменяли скоростей дыхания (V_3 и V4) и дыхательный контроль не имел достоверных отличий от контроля. В случаях Mg-T и АЛК+ Mg-T, при отсутствии достоверных изменений параметра (V_3), снижалась скорость дефосфорилированного состояния дыхательной цепи, что привело к росту дыхательного контроля.

Таким образом, показана способность исследуемых аминокислот вызывать активацию дыхательной цепи митохондрий печени и мозга старых животных, однако значительный рост стимулируемой активности СДГ не приводил к адекватной реакции самой дыхательной цепи.

Литература:

1. *Bagetta V, Barone I, Ghiglieri V, et al.* Acetyl-L-carnitine selectively prevents post-ischemic LTP via a possible action on mitochondrial energy metabolism // Neuropharmacology- 2008.-Vol.55.-P.223-229.

N-ACETYL-L-CARNITINE AND Mg-TAURINE RE-ACTIVATE MITOCHONDRIAL RESPIRATION IN BRAIN AND LIVER DECREASED WITH AGEING

Shafranovskaya E.V., Abdo M.

Institute of Pharmacology and Biochemistry of NASB, Minsk, Belarus
e-mail: farmacia@it.org.by

In aging cell, the intensity of bioenergy processes decreases; the disturbance of mitochondrial respiration is crucial in this pathology. The volume of energy produced by mitochondria decreases. The application of certain substances can intesify the activity of dehydrogenases and oxidases in the respiratory chain of mitochondria. N-acetyl-L-carnitine and Mg-taurine may be such substances.

N-acetyl-L-carnitine (NALC) is very important in human organism. It carries the rests of fatty acids from cytoplasm to mitochondria, providing thus the substrate for producing energy necessary for functioning of all organism's cells, tissues and systems. Taurine is related to sulphur containing amino acids. It exerts hypolipidemic and hypocholesteremic actions, activates the reactions of absorption and utilization of lipids and cholesterol. Our objective is to study the effect of mentioned amino acids on the mitochondrial function of liver and brain in old animals *in vivo*.

We have used in the experiments the 2-year old WAG female rats fed with standard diet of the vivarium of the Institute of Pharmacology and Biochemistry of NASB. The animals have been divided into 4 groups with 5 animals in each. The saline solution has been administered intraperitoneally to the rats from group 1. The rats from group 2 obtained NALC in 200 mg/kg dose, group 3 – Mg-T in 10 mg/kg dose, group 4 - both NALC and Mg-T in the same doses. The substances have been administered daily during four days.

The standard methods have been used to study the processes of oxidative phosphorylation in brain and liver mitochondria. Mitochondria have been isolated from liver and brain by differential centrifugation method after the decapitation. The activity of succinate dehydrogenase (SDG) has been measured. The state of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria have been determined polarographically, using enclosed Clark electrode and TPP-selective electrode (Record 4usb, Russia). We have used the succinate as an oxidation substrate. The velocity of mitochondrial respiration in defferent metabolic states has been calculated by the data of polarogram (V_0 – substrate oxidation velocity, V_3 – phosphorylating oxidation velocity, V_4 – velocity of oxidation after the phosphorylation). We have calculated also the indices which characterize the conjunction of oxidation and phosphorylation processes in mitochondria: respiratory control by Chance and Williams ($ДК_{чу}=V_3/V_4$), ADP/O coefficient. The velocities of mitochondrial respiration have been expressed in nano-atoms O_2 in 1 minute per 1 mg of mitochondria protein. The obtained data have been processed with "Statistica v.6.0" software with calculation of criterion Student. We have considered the data as verifiable at $p<0.05$.

The supply of electrons to the respiratory chain by SDG bypassing NAD and the first conjunction point decreases with ageing as well as the electron transport by SDG. NALC and Mg-T cause the rise of SDG activity in liver and brain mitochondria, and Mg-T effect has been 25% higher than that of NALC. The combination of amino acids has shown the signs of additivity and has increased the SDG activity by 110% as compared with the control. The study has shown that the intensity of oxigen consumption by mitochondria of old animals is low, and velocity V_3 is not higher than dephosphorylation velocity V_4. The increased respiration velocity V_4 in old rats testifies to the damage of inner membranes of mitochondria. And the leakage of ions through the membrane removes the membrane potential. The membrane potential ($\Delta\Psi$) after the adding of respiration substrates in old rats increases insignificantly then spontaneously quickly falls. Insignificant increase of membrane potential after the adding of ADP remains in the experimental groups.

The study of respiration velocities in liver mitochondria of old rats has shown that NALC, Mg-T and NALC + MgT increase the oxidative phosphorylation (V_3) by 23%, 30% and 18% respectively. The oxidation velocity after the phosphorylation (V_4) decreases under the effect of Mg-T and amino acids combination; the changes under the effect of NALC are not verifiable. The obtained respiratory control parameters testify to a positive influence of studied amino acids (increase from 0.65 in the control to 1.3-2.0 in the experimental groups) on the substrate of complex II.

The brain mitochondria have not changed the respiration velocities (V_3 and V_4), and the respiratory control have not differed verifiably from the control. In groups of Mg-T and NALC + Mg-T, the velocity of dephosphorylated state of respiratory chain has decreased causing thus the increase of respiratory control; there have been no verifiable changes of V_3.

Thus the ability of studied amino acids to cause respiratory chain activation in mitochondria of brain and liver of old animals has been shown; the considerable increase of stimulated SDG activity, however, has not led to the adequate reaction of the respiratory chain itself.

References:

1. *Bagetta V, Barone I, Ghiglieri V, et al.* Acetyl-L-carnitine selectively prevents post-ischemic LTP via a possible action on mitochondrial energy metabolism // Neuropharmacology- 2008.-Vol.55.-P.223-229.

СТРУКТУРА ТА ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ОКИСНО-МОДИФІКОВАНОГО АКТОМІОЗИНУ

Шелюк О.В., Мединська К.О., Нурищенко Н.Є., Пелюх Л.І.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ "Інститут біології", Київ,. Україна
e-mail: shelyuk_olga@ukr.net

З кожним роком зростає кількість наукової інформації про те, що окисне пошкодження може викликати руйнування і модифікацію не тільки ліпідів, але і білків. В роботах Дубініної О.Ю. наведені дані, щодо окислювальної модифікації білків плазми крові за умов різних патологій [1]. Але в літературі не існує даних про модифікацію скоротливих білків вільними радикалами, які генеруються при різних функціональних станах та м'язових патологіях. Тому метою дослідження стало вивчення структурно-функціонального стану складного комплексу білків скелетних м'язів актоміозину (АМ) за умов окисної модифікації.

Виділення АМ проводили за методикою Перрі [2] з модифікаціями, розробленими у відділі біофізики НДІ фізіології імені академіка Петра Богача. Окисну модифікацію АМ проводили за методом Дубініної О.Ю. [3] з нашими модифікаціями. Досліджували спонтанне (СП) та металкаталізоване окиснення (МКО) АМ. Ступінь окисної модифікації АМ виражали в мкМ 2,4-динітрофенілгідразонів (2,4-ДНФГ) на 1 мг білку. Для аналізу спектрів флуоресценції використовували відношення інтенсивностей на прямолінійних схилах спектра при двох фіксованих довжинах хвиль $B=I_{\lambda 1}/I_{\lambda 2}$ (параметр В). Такий підхід дозволяє виявити незначні зсуви спектру ~0,05 нм, чого неможливо досягти іншими методами. Реєстрацію кінетичних кривих суперспреципітації (СПП) АМ проводили на спектрофотометрі SPECORD M40 (Німеччина). З одержаних кінетичних кривих розраховували величину СПП (D_m-D_0) за Ebashi S [4]. АТФазну активність АМ визначали за кількістю неорганічного фосфату (P_i) (нмоль), що утворюється при гідролізі АТФ [5]. Розчини фотометрували при 720 нм на спектрофотометрі СФ-26.

Отримані результати показали збільшення вмісту 2,4-ДНФгідразонів в актоміозині при окисній модифікації відносно рівня, характерного для спонтанного окиснення, який приймали за контроль. Після ініціації окиснення АМ вільними радикалами вміст 2,4-ДНФгідразонів білкового комплексу зростав на 45,75 %, що свідчить про окисне пошкодження білку. Після обробки АМ окиснюючими факторами вірогідно зменшувався параметр В відносно контрольних проб на 0,015, що становить зміщення спектру флуоресценції на 0,15 нм. Таке зміщення спектру може свідчити про структурну модифікацію білкового комплексу. Параметри реакції СПП окисненого актоміозину також змінювались при окисненні. Величина реакції СПП збільшувалась на 16 % відносно значення для нативного актиміозину, а час, який необхідний для досягнення половини величини СПП зменшувався на 15 %. Було встановлено також, що під впливом окисної модифікації АМ скелетних м'язів відбувалось значне підвищення АТФазної активності. При цьому на 70,9 % збільшувалась Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазна активність та на 17 % K^{+}-АТФазна активність окисненого АМ. Отже, продемонстровано, що більш чутливою до окиснення виявилась Ca^{2+},Mg^{2+}-АТФазна активність.

Таким чином, отримані результати свідчать про високу чутливість АМ скелетних м'язів до окиснюючих факторів. Виявлені зміни функціональних показників актоміозину - АТФазної активності та СПП за умов окисної модифікації можуть бути пов'язані зі структурними перебудовами в голівці міозину актоміозинового білкового комплексу, що підтверджується зсувами спектрів флуоресценції.

Література:

1. *Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В.* Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях // Український біохімічний журнал. – Київ, 2008. – Т. 80, № 6. – С. 5–18.
2. *Тартаковский А.Д.* // Сб.: Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков / Под. ред. Иваницкого Г.Р. – Л.: Наука. – 1978. – С. 55–76.
3. *Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г.* Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопросы медицинской химии. – 1995. Т. 41, вып. 1. – С. 24–26.
4. *Ebashi S.* // J. Biochem. – 1961. – 50. – P. 236.
5. *Fiske C.H., Subbarow G.* The coloremitric determination of phosphorus//J.Biol.Cem.-1925.-V.66.,N1.- P.375-400.

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF ACTOMYOSIN UNDER OXIDATIVE MODIFICATION

Shelyuk O.V., Medynskaya K.A., Nurishchenko N.Ye., Pelyuh L.I.

Taras Shevchenko National University, Kyiv, Ukraine
e-mail: shelyuk_olga@ukr.net

An oxidative damage can cause destruction and modification not only lipids but also proteins, according to grows literature scientific information. Oxidative modification of proteins blood plasma at the terms of different pathologies is described in works of Dubinina O.Yu.[1]. But in literature there are no data about the modification of contractile proteins by free radicals that are produced in excess amount under muscle pathology. Therefore, the purpose of investigation was to study structural and functional state of actomyosin (AM) in the conditions of oxidative modification.

Actomyosin was prepared from rabbit skeletal muscles as described by Perry with modifications developed by the Department of Biophysics, Academician Peter Bogacha Institute of Physiology. Oxidative modification of proteins was performed according to method described by Dubinina et al. with our modifications. Spontaneous (SP) and metalcatalyzed oxidation (MCO) AM were studied. Rate of AM oxidative modification was evaluated in mcM 2,4-dinitrophenylhydrazone (2,4-DNPH) at 1 mg protein. The structural parameters of AM were studied by the of two waves fluorescence method, which allows to registration the small structural changes of the protein molecule. The changes in the parameter of 0.005 corresponds to the spectral shift of ~ 0.05 nm. It used the relation of intensities on the slopes of straight-line fluorescence spectrum at two fixed wavelengths $B=I_{\lambda 1}/I_{\lambda 2}$ (parameter B). Registration of superpretsypitation (SPP) kinetic curves was performed with SPECORD M40 (Germany) spectrophotometer. From the analyses of kinetic curves the value of superprecipitation (D_m-D_o) was calculated. ATPase activity (micromoles of phosphate per mg of protein per min) was calculated from inorganic phosphate (Fiske and Subbarow [5]) produced as a function of ATP hydrolysis. Absorbance of solutions at 720 nm was measured using spectrophotometer SF-26.

The increase of 2,4-DNPH level in actomyosin under oxidizing modification as compared with level for spontaneous oxidation, which we accept for the control, was observed. After initiation of free radicals action 2,4-DNPH level increase on 45,75 %, that testifies oxidizing damages in proteins complex. The parameter B as compared with the control samples decrease on 0,015 after oxidation. This changes correspond with shift of fluorescence spectrum peak on 0,15 nm. Such displacement of spectrum can indicate the structural modification of actomyosin complex. The parameters of superprecipitation reaction also changed under oxidation. The value of superprecipitation increase on 16 % in relation to the value for native actomyosine, and the time which is needed for achievement the half magnitude of this parameter diminishe on 15 %. It was also shown, that under oxidizing modification the ATPases activity of skeletal muscles actomyosin was the considerable increased. Thus on 70,9 % it was raised Ca2+,Mg2+-ATPase activity and on 17 % K+-ATPase activity. Consequently, it is shown, that the Ca2+,Mg2+-ATPase activity more sensible to oxidation.

Thus, the results taken together testify to the high sensitiveness of the skeletal muscles actomyosin to the oxidizing factors. The changes of functional characteristics of actomyosin - ATPase activity and superprecipitation in the condition of oxidizing modification can be related to structural alterations in the head of myosin in actomyosin protein complex, that is confirmed by the changes of fluorescence spectrums.

ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ ТЕРПЕНФЕНОЛЫ – НОВЫЙ КЛАСС БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

[1]Шишкина Л.Н., [1]Маракулина К.М., [1]Крамор Р.В., [1]Луканина Ю.К., [2]Плюснина С.Н., [2]Шевченко О.Г.,[3]Чукичева И.Ю., [3]Кучин А.В.

[1] Учреждение Российской академии наук Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия; e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru
[2] Учреждение Российской академии наук Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия
[3] Учреждение Российской академии наук Институт химии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия

Актуальность поиска новых биологически активных веществ (БАВ), синтезированных на основе природного сырья, определяется их относительно низкой токсичностью для организма. Перспективными БАВ являются полусинтетические терпенфенолы, синтезированные на основе древесной зелени хвойных и содержащие в качестве алкильных заместителей изоборнильную группировку, поскольку для одного из них выявлен широкий спектр биологической активности [1-4]. Как известно, биологическая активность большинства соединений обусловлена их способностью как оказывать влияние на регуляцию процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), так и воздействовать на структурное состояние мембран [5].

Целью работы являлось изучение антиоксидантных, мембранопротекторных и мембранотропных свойств изоборнилфенолов (ИБФ) а различных системах. Исследованы следующие соединения: 2-изоборнилфенол (I), 4-метил-2-изоборнилфенол (II), 4-метил-2,6-диизоборнилфенол (III), 2-метил-6-изоборнилфенол (IV), 2-оксиизоборнилфенол (V), а также стандартный антиоксидант ионол (ВНТ).

Одним из путей влияния на регуляцию ПОЛ является способность БАВ разлагать пероксиды, т.е. их антипероксидная активность (АПА), Показано, что все ИБФ обладают АПА, величина которой обусловлена степенью затрудненности ОН-группы и, возможно, распределением электронной плотности в молекуле. По уменьшению АПА все изученные соединения располагаются в следующей последовательности: I ≥ III ≥ IV ≥ V ≥ II > ВНТ. ИБФ влияют на величину АПА лецитина (смесь природных липидов, основной фракцией которых является фосфатидилхолин), что обусловлено их комплексообразованием с фосфолипидами (ФЛ). Наличие комплексов ИБФ с ФЛ подтверждено методами УФ- и ИК-спектроскопии. В образовании комплексов участвуют ОН-группа ИБФ, эфирная С=О связь гидрофобной цепи ФЛ и N-C связь холиновой группы фосфатидилхолина и сфингомиелина. Соотношение компонентов в составе комплекса зависит от природы ФЛ и структуры исследованных фенолов.

Мембранопротекторные свойства ИБФ и ВНТ изучены на модели индуцированного пероксидом водорода гемолиза эритроцитов крови мышей. Показано, что способность ИБФ защищать мембрану эритроцитов от окислительного гемолиза существенно зависит как от структуры, так и от концентрации соединения: ИБФ III и V и ВНТ ингибировали гемолиз при всех исследованных концентрациях фенолов, в то время как ИБФ I, II и в меньшей степени IV в высоких концентрациях проявляли цитотоксический эффект. При этом все изученные ИБФ и ВНТ показали способность ингибировать накопление продуктов окисления, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой, в суспензии эритроцитов, что свидетельствует о их способности тормозить ПОЛ в клетке.

Изучение поверхностной архитектоники эритроцитов крови мышей методом сканирующей электронной микроскопии подтвердило способность ИБФ и ВНТ взаимодействовать с мембраной эритроцита. Переход нормальных дискоцитов в стоматоциты (необратимая предгемолитическая форма клетки), как полагают, связан со способностью БАВ проникать во внутренний ФЛ бислой мембраны. Выявлена взаимосвязь между гемолитической активностью изученных соединений при инкубации их с эритроцитами в течение 4 час и процентом образовавшихся в суспензии стоматоцитов. При инкубации эритроцитов с цитотоксичными ИБФ I, II, и IV в концентрации 100 мкМ стоматоциты составляют более 70 % клеток выживших клеток, в то время как в присутствии ИБФ III и V и ВНТ их доля не превышает 7,3 %.

Таким образом, биологическая активность ИБФ обусловлена тем, что они способны как влиять на разные стадии процесса регуляции ПОЛ, так и воздействовать на структурное состояние клеточных мембран. Отсутствие линейной корреляции «биологический эффект – доза», зависимость мембранопротекторной активности от химической структуры и физико-химических характеристик ИБФ вызывает необходимость детального изучения механизма их воздействия на биологические объекты и отбора наиболее перспективных для дальнейших исследований.

***Литература*:**

1. Патент № 2 347 661 C2 (РФ)
2. *М.Б. Плотников, В.И. Смольякова, И.С. Иванов, А.В. Кучин, И.Ю. Чукичева, Е.А. Краснов* // Антитромбогенная и антитромбоцитарная активность производного орто-изоборнилфенола – Бюлл. Эксп. Биол. и мед., 2008, 145(3), 296-299.
3. *М.Б. Плотников, Г.А. Чернышева, В.И. Смольякова, И.С. Иванов, А.В. Кучин, И.Ю. Чукичева, Е.А. Краснов* // Нейропротекторные эффекты диборнола и механизмы действия при ишемии мозга – Вестник Росс. АМН, 2009, № 11, 12-17.
4. *И.Ю. Чукичева, И.В. Федорова, Е.В. Буравлев, А.Е. Лумпов, Ю.Б. Вихарев, Л.В. Аникина, В.В. Гришко, А.В. Кучин* // Противовоспалительная активность производных изоборнилфенолов – Химия природных соединений, 2010, № 3, 402-403.
5. *E.B. Burlakova* // Bioantioxidants yesterday, today, tomorrow. In: Chemical and Biological Kinetics. New Horizons. Vol. 2 Biological Kinetics. Eds. E.B. Burlakova, S.D. Varfolomeev. Leden, Boston: VSP, 2005, 1-33.

SEMISYNTHETIC TERPENEPHENOLS IS A NEW CLASS OF THE BIOLOGICAL ACTIVITE SUBSTANCES

[1]Shishkina L.N., [1]Marakulina K.M., [1]Kramor R.V., [1]Lukanina Yu.K., [2]Plyusnina S.N., [2]Sevchenko O.G.,[3]Chukicheva I.Yu., [3]Kutchin A.V.

[1]Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru
[2] Institute of Biology, Komi SC, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia
[3]Institute of Chemistry, Komi SC, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Russia

The actuality of the search of the new biological active substances (BAS) which are synthesized on the natural raw material base is due to their respectively low toxicity for organism. Semisynthetic terpenphenols synthesized on the base of the coniferous greenery and consisting the isobornyl group as the alkyl substituents are a perspective BAS because the broad spectrum of biological activity was revealed for one of them [1-4]. As known, the biological activity of the many substances is associated with their ability both to affect on the regulation of the lipid peroxidation (LPO) processes and to influence on the structural state of membrane [5].

Tha aim of this research was the study of the antioxidative, membrane protective and membrane-acting properties of isobornylphenols in the different systems. The following compounds were investigated: 2-isobornylphenol (I), 4-methyl-2-isobornylphenol (II), 4-methyl-2,6-diisobornylphenol (III), 2-methyl-6-isobornylphenol (IV), 2-isobornyloxyphenol (V), and also the standard antioxidant ionol (BHT).

The ability of BAS to decompose peroxides, i.e. their antiperoxide activity (APA), is one of the pathway of the effect on the LPO regulation. It is shown that the all IBP have APA, value of which is due to the sterically hindrance of OH-bond in phenol and obviously the electron density distribution in molecule. By the decreasing of APA all studied compounds form following sequence: I ≥ III ≥ IV ≥ V ≥ II > BHT. IBP have an influence on the APA value of lecithin (the mixture of the natural lipids, the main fraction of which is phosphatidyl choline). That results from their complexation with phospholipids (PL). The existence of these complexes were confirmed by UV- and IR-spectroscopy methods. Complexes is shown to form due to the interaction of OH-group of IBP, ester C=O-bond of the PL hydrophobic chain and N-C-bond of the phosphatidyl choline and sphingomielin choline group. The molar ratio of components in the complexes depends on the PL nature and the studied phenol structure.

The membrane protective properties of IBP and BHT were studied by the model of the hydrogen peroxide induced hemolysis of the mice blood erythrocytes. It is shown that the ability of IBP to protect the erythrocyte membrane from the oxidative hemolysis substantially depends on the phenol structure and their concentration. IBP III and V and BHT inhibited the hemolysis at all studied concentrations of phenols, while IBP I, II and less IV showed the cytotoxic effect at the high concentrations. Besides, all studied IBP and BHT have the ability to inhibit the accumulation of the oxidation products which are reacted with 2-thiobarbituric acid in the erythrocyte suspension, that they testified their ability to inhibit LPO in cells.

The ability of IBP and BHT to interact with the erythrocyte membrane was confirmed by using the scanning electron microscopy for the investigation of the surface architectonics of the mice blood erythrocyte. As assumed, the alteration of the normal discocyte shape to stomatocytes (irreversible pre-hemolytic cell form) is due to the ability of BAS to insert into the inner PL bilayer of membrane. The interrelation between the hemolytic activity of all compounds under their incubation with erythrocytes during 4 h and the stomatocyte percentage is revealed. Stomatocytes consist of more 70% from survival cells under the erythrocyte incubation with the cytotoxic IBP I, II and IV at their concentration of 100 μM, while their share did not exceed 7,3% in the presence of IBP III and V and BHT.

Thus, the biological activity of IBP is due to their ability both to influence on the different stage of the LPO regulatory process and to affect on the structural state of the cell membrane. The absence of the “biological effect – dose” linear correlation, the dependence of the membrane protective activity on the chemical structure and physicochemical characteristics of IBP causes the need of the detail study of their effect on biological objects and the selection of the more perspective for investigation.

References:

1. Patent No 2 347 661 C2 (RF)
2. *M.B. Plotnikov, V.I. Smol’yakova, I.S. Ivanov, A.V. Kutchin, I.Yu. Chukicheva, E.A. Krasnov* // Antiprombogenic and antiplatelet activity of ortho-isobornylphenol derivative - Bull. Exp. Biol. Med. 2008, 145(3), 296-299.
3. *M.B.. Plotnikov, G.A. Chernyshova, V.I. Smo’yakova, I.S. Ivanov, A.V. Kutchin, I.Yu. Chukicheva, E.A. Krasnov* // Neuroprotective effects of dibornol and mechanisms of the action under brain ischemy - Vestnik Russian AMS, 2009, No 11, 12-17.
4. *I.Yu. Chukicheva, I.V. Fedorova, E.V. Buravlev, A.E. Lumpov, Yu.B. Vikharev, L.V. Anikina, V.B. Grishko, A.V. Kutchin* // Antiinflammatory activity of isobornylphenols - Chemistry of natural compounds, 2010, No 3, 402-403.
5. *E.B. Burlakova* // Bioantioxidants yesterday, today, tomorrow. In: Chemical and Biological Kinetics. New Horizons. Vol. 2 Biological Kinetics. Eds. E.B. Burlakova, S.D. Varfolomeev. Leden, Boston: VSP, 2005, 1-33.

ЦИТОПРОТЕКТОРНЫЕ И ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОФЛАВОНОИДОВ

Шилов В. В., Анисович М.В., Красненкова Т.П., Афонин В.Ю., Кардаш О.Ф., Корда А.В., Тихонова Н.Г., Шафрановская Е.В.

Государственное учреждение «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси», Минск, Беларусь
e-mail: cardiopharmacology@tut.by

Цель исследования: Оценить гиполипидемические и цитопротекторные свойства флавоноидов растения семейства Fabaceae.

Материалы и методы исследования. Для оценки гиполипидемических свойств биофлавоноидов (БФ) 30 крыс-самцов линии Wistar (вес 210-250 г.) были рандомизированы на пять групп. Крысы 1-й группы являлись биологическим контролем. Животным 3-й, 4-й и 5-й экспериментальных групп (ЭГ) 5 дней в неделю в течение 1 мес внутрижелудочно вводили БФ в дозах 3 мг/кг, 10 мг/ кг и 30 мг/кг, соответственно. Животные 2 группы (плацебо-контроль) получали раствор крахмала в эквивалентном объеме. Экспериментальная гиперлипидемия вызывалась внутрибрюшинным введением твина-80 из расчета 200мг/100г массы тела. Через 12 ч после введения твина-80 у крыс производился забор крови из орбитального синуса для определения содержания холестерина и триглицеридов на биохимическом анализаторе “Hitachi-109” (Япония).

Для оценки цитопротекторных свойств изучались молекулярно-генетические показатели плоидности клеток фибробластов человека на проточном цитофлуориметре FAX Ventage (Becton Dikinson, USA) и Cytomics FC500 (“Beckman Coulter”). На основании гистограмм распределения содержания ДНК в клетках была проведена оценка основных показателей клеточного цикла (распределение клеток по стадиям), частоты встречаемости клеток с микроядрами и апоптических.

Результаты исследования: Исследование липидного спектра крыс показало, что концентрация общего холестерина (ОХ) и триглицеридов (ТГ) в контрольной группе была увеличена до 2,00±0,14 и 1,89±0,12 мкмоль/л, соответственно, тогда как при применении флавоноидов в дозе 10 мг/кг наблюдалось значимое ($p<0,01$) снижение как уровня общего холестерина на 22,5% (до 1,55±0,08 мкмоль/л), так триглицеридов на 31,7% (до 1,29±0,08 мкмоль/л). Уровень ТГ в 4-ой ЭГ достоверно ($p<0,01$) отличался от показателей биологического контроля (1,68±0,14 мкмоль/л). Другие дозы БФ (3 мг/ кг и 30 мг/ кг) не вызывали существенных изменений в исследованных нами биохимических показателях.

Проведенные исследования на культуре фибробластов человека (КФЧ) показали, что БФ, введенные в дозах 1,0 мг/л и 10,0мг/л статистически значимо снижают число клеток с микроядрами ($p<0,05$). Так, частота клеток с микроядрами в КФЧ без БФ составляла 25,2±3,9%, тогда как с БФ в дозах 1,0 мг/л и 10,0мг/л данный показатель был соответственно 10,6±1,9% и 11,3±2,5%. Данный факт может быть связан с усилением контроля за повреждением уровня ДНК путем задержки клеток в G_1- фазе клеточного цикла. Так как количество клеток в G_1- фазе клеточного цикла в КФЧ без БФ (38,4±4,0%) было достоверно ($p<0,01$) меньше, чем в культурах с БФ (57,3±1,1% и 66,8±13,4%, соответственно при дозах БФ в 1,0мг/л и 10,0 мг/л). Задержка и репарация ДНК на данной фазе приводит к достоверному снижению числа клеток с микроядрами, характеризующими повреждение генетического материала. Повышение клеток с микроядрами естественно при повышении уровня пролиферации клеток, которая наблюдалась в КФЧ без БФ в отличие от экспериментальных КФЧ (42,7±1,1%, 33,2±13,4% и 61,6±4,0%, соответственно в КФЧ с 1,0мг/л БФ, 10,0 мг/л БФ и без БФ). Уровень микроядер в культуре клеток с меньшей дозировкой 0,1мг/мл БФ (28,0±1,3%) был аналогичен контрольным показателям, также как уровень пролиферации и количество клеток в G_1- фазе клеточного цикла.

Вывод: Применение флавоноидов растения семейства *Fabaceae* в дозе 10 мг/кг приводит к уменьшению холестерина и триглицеридов в крови у животных с экспериментальной гиперлипидемией. Биофлавоноиды этого растения в дозах 1,0 мг/л и 10,0мг/л обладают цитопротекторными свойствами *in vitro*.

CYTOPROTECTIVE AND HYPOLIPIDEMIC PROPERTIES OF BIOFLAVONOIDS

Shylau V., Anisovich M., Afonin V., Krasnenkova T., Kardash V., Korda A., Tsikhanava N., Shafranovska A.

Institute of pharmacology and biochemistry of NAS of Belarus, Minsk, Belarus
e-mail: farmacia@it.org.by

Objectives. The aim of this study was to determine the cytoprotective and hypolipidemic effect of Fabaceae flavanoids (BF).

Materials and methods.

For an estimation of hypolipidemic properties BF 30 male Wistar rats (weight 210-250) were randomly divided into 5 groups. The first one was biological control. Animals of 3-rd, 4-th and 5-th experimental groups (EG) received per os BF in dozes of 3 mg/kg, 10 мг/kg and 30 mg/kg respectively during 1 month (5 days in a week). Animal of 2 groups (placebo-control - PC) received a starch solution in equivalent volume. Experimental lipidemia was caused by intraperitoneal injection of twin-80 (200mg/100g body weight). The concentration of total cholesterol (TC), triglycerides (TGs) was determined after 12 hours after the twin-80 injection.

For an estimation of cytoprotective properties of BF molecular-genetic cell parameters of human fibroblast culture were studied by flow cytometer FAX Ventage (Becton Dikinson, USA) and. Cytomics FC500 (“Beckman Coulter”). Cell distribution on stages of the cell cycle, frequencies of cells with micronuclei and apoptotic cell was estimated by DNA distribution histograms.

Results.

Total cholesterol and triglyceride concentrations of PC were increased up to 2.00±0.14 and 1.89±0.12 μM/l, respectively compare with BC (1.68±0.12 and 1.68±0.14 μM/l, resp.). At the same time BF at 10 mg/kg dose significantly lowered levels of TC on 22.5% (up to 1.55±0.08 μM/l), TG on 31.7% (up to 1.29±0.08 μM/l). TG level in 4 EG was significantly ($p<0.01$) lower compared with PC TG parameters (1.68±0.14 μM/l). Treatment with BF at doses 3 mg/kg and 30 mg/kg had shown no significant ($p>0.05$) changes in TC and TG levels compared with PC.

Studies on human fibroblast culture (HFC) have shown that flavonoids introduced in doses of 1.0 mg/L and 10.0 mg/L significantly reduced the number of cells with micronuclei ($P <0.05$). So, frequency of cells with micronuclei in HFC without BF was 25.2±3.9% whereas with BF at dozes of 1.0 mg/l and 10,0мг/л this parameter was 10.6±1.9% and 1.3±2.5% resp. This fact may be associated with increased control over the level of DNA damage by delaying cells in G1-phase of the cell cycle. As the quantity of cells in a G_1 phase of a cellular cycle in HFC without BF (38.4±4.0%) was significantly ($p<0.01$) less, than in cultures with BF (57.3±1.1% and 66.8±13.4%, resp. at dozes 1.0 mg/l and 10.0 mg/l). Delay and DNA repair in this phase leads to a significant decrease in the number of cells with micronuclei characterizing damage genetic material. Increase of cells with micronuclei is naturally when cell proliferation level is increased. This was observed in HFC without BF unlike experimental HFC (42.7±1.1%, 33.2±13.4% and 61.6±4.0%, resp. in HFC with 1.0 mg/l BF, 10.0 mg/l BF and without BF).

The level of micronuclei in cell culture with a lower BF dosage (0.1 mg/l) (28.0±1.3 %) was the similar to the control parameters, also as a proliferation level and quantity of cells in G_1 phase of a cellular cycle.

Conclusion.

The use of Fabaceae flavonoids at a dose of 10 mg/kg resulted in a decrease of cholesterol and triglycerides in the blood of animals with experimental hyperlipidemia. Bioflavonoids at doses of 1.0 mg/l and 10.0 mg/l possess cytoprotective properties *in vitro.*

ВИВЧЕННЯ ПРОТИВИРАЗКОВОЇ ДІЇ КОМПЛЕКСУ АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЗА УМОВ СТРЕСОВОЇ МОДЕЛІ ВИРАЗКИ ШЛУНКА У ЩУРІВ

[1]Якубцова І.В., [1]Хілько Т.Д., [1]Преображенська Т.Д., [1]Остапченко Л.І., [2]Чехун В.Ф., [3]Макай Ш.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка[1], Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім.Р.Є. Кавецького [2], Університет Західної Угорщини[3]
e-mail: irinamaster@gmail.com

Виразкова хвороба шлунка та дванадцятипалої кишки знаходяться у центрі уваги теоретичної та практичної гастроентерології. Актуальним є застосування препаратів рослинного походження при виразковій хворобі, які відрізняються різноспрямованістю дії. Прикладом такої рослини є обліпиха (Hippophao), зокрема обліпихова олія, яка містить комплекс біологічно активних компонентів, переважно каротиноїди, токофероли, філохінони, вітаміни, мікроелементи, фітонциди, ненасичені жирні кислоти. Завдяки вмісту жиророзчинних біоантиоксидантів обліпихова олія має здатність зменшувати інтенсивність вільнорадикальних процесів і захищає від пошкодження клітинні мембрани, стимулює репаративні процеси і прискорює загоювання ушкоджень. Лікувальні властивості обліпихи можуть бути підвищені при додаванні екстрактів з інших лікарських рослин. Раніше нами було досліджено антивиразкову дію окремо екстракту фенугрека (Trigonella) та вітаміну U (метилметіонінсульфонія хлориду). Екстракт фенугрека, який містить у своєму складі галактоманани, амінокислоти, ліпіди, ненасичені жирні кислоти, полісахариди, стероїдні сапогеніни, алкалоїди, флавоноїди, вітаміни, мікроелементи має відновлюючий вплив на біохімічні властивості і структурно-функціональний стан слизових оболонок шлунка та дванадцятипалої кишки. Вітамін U стимулює процес регенерації виразок шлунка і дванадцятипалої кишки.

Метою даної роботи було проведення порівняння ефективності противиразкової дії різних доз комплексу активних компонентів екстрактів обліпихи, фенугрека та вітаміну U при експериментальному ураженні шлунка у щурів. Вивчення дії та визначення оптимальної захисної дози досліджуваного комплексу проводили за умов гострої стресової моделі виразки у щурів. Тварин розподіляли на 6 груп: перша група тварин - контроль, друга група - тварини, у яких моделювали гостру стресову виразку; 3, 4, 5, 6 – групи тварин, у яких моделювали гостру стресову виразку та вводили комплексний екстракт у різних дозах (200, 300, 400, 500 мг/кг) внутрішньошлунково один раз на добу протягом 8 діб. По закінченні дослідів тварин виводили з експерименту в умовах евтаназії, вилучали шлунки та проводили їх макроскопічні та гістологічні дослідження. Ураження слизової оболонки шлунку при виразкоутворенні у щурів оцінювали по кількості уражень (виразок; ерозій; масивних крововиливів; краплинних крововиливів) на один шлунок.

В експериментальній моделі виразки простежувалась характерна етапність виразкоутворення та проявів регенеративних процесів, які мали чіткі морфологічні ознаки. При гострому стресі процес виразкоутворення починається від серозної оболонки, проникаючи до слизової. Після введення протягом 8 діб комплексу активних компонентів екстрактів обліпихи, фенугрека та вітаміну U спостерігали зменшення набряку серозної та м′язової оболонок. Менших розмірів набув набряк слизової оболонки шлунка, дистрофічні зміни клітин як поверхневого епітелію, так і клітин фундальних залоз були менше вираженими, порівняно з аналогічним терміном при дії стресу. Площа виразки зменшувалася за рахунок формування грануляційної тканини та тяжів епітеліальних клітин, які починали покривати зону ураження. Багаторазове введення досліджуваного комплексу сприяло значному підвищенню вмісту лізоциму в слизовій оболонці, що може свідчити про інтенсивні регенеративні процеси в слизовій оболонці. Відомо, що високий вміст лізоциму визначається в регенеруючих ділянках слизової оболонки при загоєнні виразкового дефекту. Введення комплексу активних речовин обліпихи, фенугрека і вітаміну U протягом 8-ми діб виявило, що найбільш ефективною була доза 400 мг/кг. Доза 500 мг/кг була несприйнятливою для шлунка щурів.

Комплексний екстракт обліпихи, фенугрека і вітаміну U для досліджень був наданий професором Університету Західної Угорщини Ш. Макай.

Робота виконувалась за підтримки гранту НАНУ «Assessment of natural biologically active compounds as having antiulceros and anticancer potential».

STUDY OF COMPLEX ANTIULCEROUS ACTIVE SUBSTANCES IN CONDITION OF THE STRESS MODEL GASTRIC ULCER IN RATS

[1]Yakubtsova I.V., [1]Khilko T.D., [1]Preobrazhenska T.D., [1]Ostapchenko L.I., [2]Chekhun V.F., [3]Makay S.

[1]Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine
e-mail: irinamaster@gmail.com
[2]R.E.Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology & Radiobiology
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
[3]University of the West Hungary, Hungary

Ulcer of stomach and duodenum are the focus of theoretical and practical gastroenterology. It is recognized to be effective the use of herbal products with antiulcers action that show different benefitioal properties. An example of this plant is sea-buckthorn (Hippophao), especially sea-buckthorn oil, which contains a complex of biologically active components, mainly carotenoids, tocopherol, filohinony, vitamins, trace elements, phytoncides and unsaturated fatty acids. Due to the fat-soluble bioantioxidants, sea-buckthorn oil has the ability to reduce intensity of free radical processes and protects against damage to cell membranes as well as stimulates reparative processes and accelerates the healing of injuries. Healing properties of sea buckthorn can be increased by adding of extracts from other medicinal plants. Previously, we have investigated the antiulcer effects separately of fenugreek extract (Trigonella) and vitamin U (*S*-Methylmethionine chloride). Fenugreek extracts, which contain galactomannans, amino acids, lipids, unsaturated fatty acids, polysaccharides, steroid sapohenins, alkaloids, flavonoids, vitamins, trace elements are showing a restoring effect on the biochemical properties and structural-functional state of the mucous membranes of the stomach and duodenum. Vitamin U stimulates the regeneration of gastric ulcers and duodenal ulcers.

The purpose of this study was to compare the effectiveness of application of different doses of antiulcerous complex active components of sea buckthorn extracts, fenugreek extracts and vitamin U in experimentally induced gastric lesions in rats. Study of action and determination of the optimal protective dose was performed under induced stress ulcer model in rats. The animals were divided into 6 groups: the first group of animals - control, the second group - animals with induced acute stress ulcer, 3, 4, 5, 6 - groups of animals induced with acute stress ulcer and complex extracts were injected with different doses (200 , 300, 400, 500 mg / kg) intragastristically once per day for 8 days. After the animal experiments was derived from the experiment in euthanasia, bereaved of their stomachs and taken macroscopic and histological studies. Gastric ulceration in rats assessed by the number of lesions (ulcers, erosions, massive hemorrhage, hemorrhage drops) per one stomach.

In experimental models of ulcers development, there were observed typical ulceration stages and manifestations of regenerative processes, which have distinct morphological characteristics. In acute stress ulceration process starts from the serosa and well penetrating to the mucous. After injection of the complex for 8 days of active components of sea buckthorn extracts, fenugreek extracts and vitamin U showed decreased edema in serous and muscle membranes. Smaller acquired gastric mucosal swelling, degenerative changes of surface epithelial cells as well as cells of fundal glands were less pronounced compared to the same period under the action of stress. Ulcer area decreased due to the formation of granulation tissue and epithelial cells which tended to cover the area of affection. Multiple input of studied complexes promoted the increasing content of lysozyme in mucous, which indicate the intense regenerative processes in the mucosa. It is known that high levels of lysozyme are identified in regenerating areas of mucosal ulcer during healing. Introduction of a complex of active substances of sea buckthorn, fenugreek extracts and vitamin U for 8 days revealed that the most effective dose was 400 mg / kg. The dose of 500 mg / kg for rats was unresponsive to the stomach of rats.

Active substances of sea buckthorn, spice and vitamin U were provided by Dr. Shandor Makai from University of Western Hungary.

The work was conducted under the grant from NAS of Ukraine via «Assessment of natural biologically active compounds as having antiulceros and anticancer potential».

THE USE OF ENDOPHYTES TO OBTAIN BIOACTIVE COMPOUNDS AND THEIR APPLICATION IN BIOTRANSFORMATION PROCESS: ANTIMICROBIAL COMPOUNDS

Bukuru Hussein

Université du Burundi, Burundi
e-mail: h_bukuru@yahoo.com

The term “endophytes” includes a suite of microorganisms that grow intra-and/or intercelullarly in the tissues of higher plants without causing over symptoms on the plants in which they live, and have proven to be rich sources of bioactive natural products. Mutualism interaction between endophytes and host plants may result in fitness benefits for both partners. The endophytes may provide protection and survival conditions to their host plant by producing a plethora of substances which, once isolated and characterized, may also have potential for use in industry, agriculture, and medicine.

Metabolites bearing antibiotic activity can be defined as low-molecular-weight organic natural substances made by microorganisms that are active at low concentrations against other microorganisms. Endophytes are believed to carry out a resistance mechanism to overcome pathogenic invasion by producing secondary metabolites. So far, studies reported a large number of antimicrobial compounds isolated from endophytes, belonging to several structural classes like alkaloids, peptides, steroids, terpenoids, phenols, quinines, and flavonoids. The discovery of novel antimicrobial metabolites from endophytes is an important alternative to overcome the increasing levels of drug resistance by plant and human pathogens, the insufficient number of effective antibiotics against diverse bacterial species, and few new antimicrobial agents in development, probably due to relatively unfavorable returns on investment. The antimicrobial compounds can be used not only as drugs by humankind but also as food preservatives in the control of food spoilage and food-borne diseases, a serious concern in the world food chain. Many bioactive compounds, including antifungal agents, have been isolated from the genus *Xylaria* residing in different plant hosts, such as “sordaricin” with antifungal activity against *Candida albicans;* “mellisol” and “1,8- dihydroxynaphthol 1-O-a-glucopyranoside” with activity against herpes simplex virus-type 1; “multiplolides A and B” with activity against *Candida albicans.* The bioactive compound isolated from the culture extracts of the endophytic fungus *Xylaria* sp. YX-28 isolated from *Ginkgo biloba* L. was identified as “7-amino-4-methylcoumarin”. The compound presented broad-spectrum inhibitory activity against several food-borne and food spoilage microorganisms including *S. aureus, E. coli, S. typhia, S. typhimurium, S. enteritidis, A. hydrophila, Yersinia* sp.*, V. anguillarum, Shigella* sp.*, V. parahaemolyticus, C. albicans, P. expansum,* and *A. niger,* especially to *A. hydrophila*, and was suggested to be used as natural preservative in food.

Endophytes have proven to be rich sources of novel natural compounds with a wide-spectrum of biological activities and a high level of structural diversity. The use of endophytes as biocatalysts in the biotransformation process of natural products assumes greater importance. However, the application of microorganisms by the food and pharmaceutical industries to obtain compounds of interest is still modest, considering the great availability of useful microorganisms and the large scope of reactions that can be accomplished by them.

ROLE OF BLACK TEA IN MODULATING BLOOD REDOX BALANCE *IN VIVO* IN RATS

Dileep Kumar, Syed Ibrahim Rizvi

Department of Biochemistry, University of Allahabad, Allahabad, India
e-mail: deepmicro88@gmail.com

The health benefits of green tea catechins have been extensively investigated but there are fewer studies on black tea. The present study was undertaken to evaluate the antioxidant effect of black tea in rats supplemented with black tea infusion. Male rats (Wistar strain) were divided in two groups: 1. Control, and 2. Experimental: receiving black tea infusion for 1 week, 5 weeks and 8 weeks. After black tea supplementation, blood was collected from rats and studies were carried out on erythrocytes and plasma to determine oxidative stress parameters. Our results show that experimental rats had higher red cell intracellular glutathione (GSH) and lower lipid peroxidation compared to control group. The total antioxidant potential of the plasma, measured in terms of FRAP, was higher in rats supplemented with black tea. We also show that the activity of erythrocyte plasma membrane redox system (PMRS) was lower in experimental rats. The antioxidant effect of black tea infusion was dependent on the duration of the dose period; maximum effect was observed after 8 weeks. Our results signify that rats receiving black tea supplementation had better redox homeostasis compared to control group. A lower PMRS activity is indicative of a better redox balance between the erythrocyte and plasma.

INHIBITORY EFFECT OF *SORGHUM BICOLOR* ROOT EXTRACT ON CELL PROLIFERATION OF HUMAN OSTEOSARCOMA CELLS

Stan M.S., Sturzoiu C., Anton M., Petrescu M., Stoian G.

Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Bucharest, Faculty of Biology, Bucharest, Romania
e-mail: gigistoian2007@yahoo.com

Sorghum root extract is a rich source of various phytochemicals including tannins, phenolic acids, anthocyanins and phytosterols [1]. Among cereals, sorghum has the highest content of phenolic compounds reaching up to 6% (w/w) in some varieties [2]. Available experimental evidence suggests that sorghum extracts can have significant anti-inflammatory, anti-cancer, and anti-diabetic activity.

The purpose of this study was to investigate possible *in vitro* cytotoxic effects of sorghum root extracts against human osteoblast cancer cell line. In order to establish the anti-proliferative sorghum root action, the effects of root extracts (1 mg/mL) prepared from five varieties of sorghum on cultured human osteosarcoma (G292) cells were evaluated by light microscopy, and by cell proliferation and standard cytotoxicity assays. Cell viability was determined by means of MTT assay [3] after exposure to sorghum extract with phenolic compounds level 850 µg/mL measured by Folin-Ciocalteu assay [4] for 6, 12 and 24 hours. Phenolics sorghum extracts inhibited almost 70% of osteoblast cell growth (1). Morphology changes and significant inhibition on the proliferation of sorghum treated cells (2) were observed in comparison with control cells (3) by light microscopy.

In conclusion, sorghum root extract was very efficient in reducing the viability of human osteoblast cancer cells. According to our results, sorghum remains a major source of total phenolics which has promising potential for human anti-osteosarcoma therapy development.

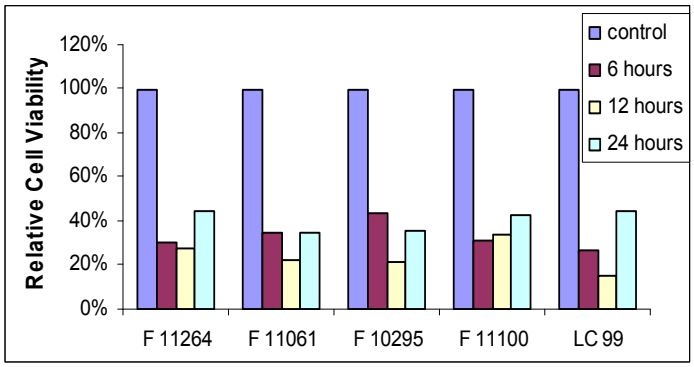


Fig. 1. Percent viability measured on osteoblast cell after treatment with different sorghum extracts (1 mg/mL) for 6, 12 and 24 hours, by MTT assay.

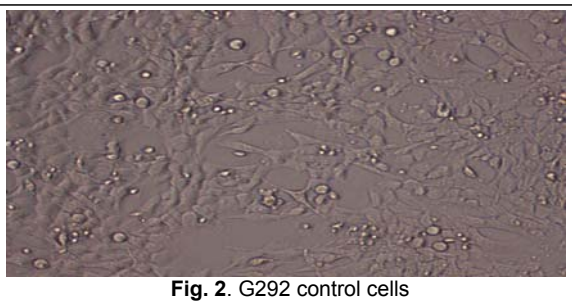


Fig. 2. G292 control cells

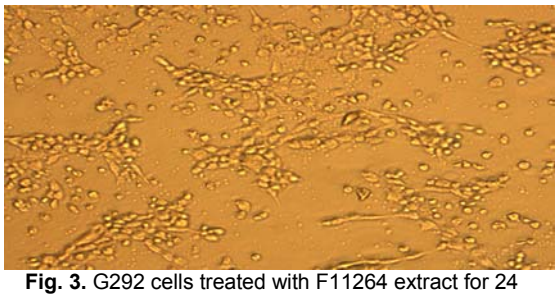


Fig. 3. G292 cells treated with F11264 extract for 24

This work was supported by ZYSOPROD, PN II62-068/2008 research national grant.

References:

1. *J.M. Awika, L.W. Rooney.* // Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health, Phytochemistry, 2004, vol. 65, pp. 1199–1221
2. *M.H. Dicko, H. Gruppen, A.S. Traoré, A.G.J. Voragen, W.J.H. van Berkel.* // Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use, Biotechnol. Mol. Biol. Rev., 2006, vol. 1 (1), pp. 21-38
3. *T. Mosmann.* // Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunolog Meth, 1983, vol. 65, pp. 55–63
4. *V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós.* // Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, Methods in Enzimology, 1999, vol. 299. pp. 152

ВЛИЯНИЕ CASTOREUM НА СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ВОСПАЛЕННОЙ ОБОДОЧНОЙ КИШКИ КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Емельянова А.А., Жукова Н.Д., Пашкевич С.Г.

Институт физиологии Национальной Академии Наук Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: skypasht@mail.ru

Сведения об использовании бобровой струи (Castoreum) известны с давних времен. В XVI веке препараты из бобровой струи (БС) входили в круг средств официальной медицины. Спиртовой экстракт (настой) БС – душистое вещество и фиксатор запаха, широко применяемый в парфюмерии. Основные компоненты: ацетофенон, бензиловый спирт, бензойная кислота, борнеол, n-этилфенол, о-крезол, гваякол, коричная и салициловая кислоты, а всего – более 40 ценнейших компонентов. Это – буроватая творожистая жидкость, плотностью 1.011 г/см³, температурой плавления 46-47°С и температурой кипения 218°С. В настоящее время в медицине используется как антиспазматическое и успокаивающее средство, в том числе и при болезнях желудочно-кишечного тракта. Научное обоснование медицинского применения БС фрагментарно. Поэтому задача настоящего исследования состояла в изучении влияния препарата бобровой струи на ультраструктуру воспаленной ободочной кишки крыс в эксперименте.

Исследования выполнены в соответствии с этическими нормами обращения с животными, а также требованиями мирового сообщества «Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 1986) и проведены на белых крысах-самцах массой 0.25±0.03 кг (n=15). Модель экспериментального воспаления ободочной кишки создавалась путем введения 1мл 4%-ой уксусной кислоты. Первая группа животных находилась в стандартных условиях вивария. Второй группе в течение 7 дней в питье добавляли БС (основа на 70° спирту) в разведении 1 мл на 200 мл воды. Третья группа животных пила добавленный в воду 70º спирт в аналогичном разведении. Кусочки воспаленной ободочной кишки - извлекали на 8-е сутки эксперимента и обрабатывали по методике (Боголепов Н.Н.) в нашей модификации. Просмотр материала вели на электронном микроскопе JEM – 100 CX (Япония).

У животных первой группы болезнь воспаленной кишки проявлялась, прежде всего, как абсцесс крипт с накоплением нейтрофильных лейкоцитов в *lamina propria*. Нарушалась целостность эпителиального барьера, в результате чего разрушались или атрофировались крипты, изменялся процесс выделения слизи, уменьшался объем нервных элементов и т.д. Клинические проявления изменений со стороны желудочно-кишечного тракта при воспалении, осложнения со стороны кишечника при хронических процессах, а также результаты лабораторных исследований широко освещены в литературе.

Животные с экспериментальным воспалением кишки выпивали не более 10-15 мл воды. После применения БС объем потребляемой воды возрос в два раза, животные становились активными, охотно принимали пищу, шерсть была гладкая и блестящая. Результаты электронно-микроскопического исследования показали, что ультраструктура цитоплазматических органелл, отвечающих за энергетический потенциал клеток белковый синтез и метаболизм, поврежденной ободочной кишки, восстанавливается. Бокаловидные клетки были заполнены секреторными гранулами. Ультраструктура цитоплазматических органелл энтероцитов (митохондрий, гранулярного эндоплазматического ретикулума, рибо- и полисом) не отличалась от таковой интактных животных, а в большинстве случаев отмечалась их заметная активация. К мембранам ядер энтероцитов вплотную прилегали митохондрии, свидетельствуя об активации ядерно-цитоплазматических отношений. Отмечено восстановление структуру не только органелл, но и межклеточных контактов, где энтероциты тесно прилежат друг к другу. В слизистой и подслизистой оболочках кишки, как правило, выявлялись лимфоциты и плазматические клетки, а также активно опустошающиеся энтерохромаффинные. Следует отметить, что толщина подслизистого слоя кишки не превышала таковую интактных крыс. Особенно показательна реакция нервных структур толстого кишечника. Это касается элементов как подслизистого, так и межмышечного нервных сплетений, рост числа которых и богатство составляющих их цитоплазматических органелл были отчетливо выражены. Кроме того, возросло количество клеток Кахала, их отростков и тесных контактов последних с нервными и гладкомышечными элементами кишки. Исследования на животных, которые пили разведенный спирт показали, что ультраструктура слизистой оболочки и подслизистого слоя кишки восстанавливаются лишь в определенной степени. На фоне нормализации структуры бокаловидных клеток, энтероцитов и составляющих их органелл наблюдались нарушения межклеточных контактов. Значительное число коллагеновых волокон, присутствие дегенеративно измененных нервных элементов в сплетениях кишки указывали на неполное восстановление их структуры.

Итак, применение БС при воспалительных заболеваниях кишечника способствует восстановлению ультраструктуры и, следовательно, его функции.

ВЛИЯНИЕ ПЛАЗМИНОГЕНА И СТРЕПТОКИНАЗЫ НА СОСТОЯНИЕ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО ЗВЕНА АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ, АТФ- И CA^{2+}-АКТИВИРУЕМЫЙ ПРОТЕОЛИЗ И УЛЬТРАСТРУКТУРУ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ОСТРОЙ АММОНИЙНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Жук О.Н., Никандров В.Н., Лукашевич В.С., Тумилович М.К., Мардас Д.К., Мороз Ю. В., Рудниченко Ю.А.

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: nikandrov@fizio.bas-net.by

Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах массой 300 г (n=6 в каждой группе). Модель острой аммонийной интоксикации создавали внутрибрюшинным введением хлорида аммония из расчета 10 мМ/кг массы животного. В качестве контроля рассматривали показатели от интактных крыс (контроль 1) и от животных с острой аммонийной интоксикацией (контроль 2). Крысам опытных групп под наркозом (уретан+нембутал) вводили в межоболочечное пространство головного мозга стрептокиназу – 40 МЕ на крысу или плазминоген – 20 мкг на крысу, все в объеме 20 мкл на животное.

В гомогенатах мозга изучали изменение активности глутаматдегидрогеназы (ГДГ, КФ 1.4.1.2), аланинаминотрансферазы (АЛТ, КФ 2.6.1.2) и аспартатаминотрансферазы (АСТ, КФ 2.6.1.1) как вероятных путей детоксикации аммиака путем синтеза аминокислот в мозге при острой аммонийной интоксикации, состояние АТР- и Ca^{2+}-активируемого протеолиза, а также изменение ультраструктуры клеток передней доли головного мозга крыс.

При совместном введении хлорида аммония совместно с плазминогеном или стрептокиназой впервые выявлены особенности изменений уровня активности энзимов трансаминирования, а также уровня АТР- и Ca^{2+}-активируемого протеолиза в головном мозгу крыс. Исследования ультраструктуры клеток выявили, что и стрептокиназа, и плазминоген могут оказывать выраженные эффекты по сдерживанию развития индуцируемой NH_4^+ нейродегенерации. Они ослабляют последствия разрушительного влияния NH_4^+ на структуру клеток нервной системы и потенциируют развитие в них репаративно-регенеративных процессов. При введении крысам стрептокиназы совместно с хлоридом аммония на общем фоне умеренных реактивных изменений, которые также представлены в нервных клетках в виде некоторого расширения эндоплазматической сети, образования лопастей ядрами, конденсацией ядерного хроматина, характерным было резкое увеличение количества митохондрий по всей цитоплазме и в особенности вокруг ядра. Новообразование митохондрий рассматривается как репаративная реакция клетки, выражение активации окислительных процессов. Совместное с хлоридом аммония введение плазминогена также способствует сохранности ультраструктуры клеток и отличается повышенной насыщенностью полисомами цитоплазмы клеток, что является признаком репаративных процессов. Астроциты сохраняют свою форму, в них не отмечается резко выраженных признаков деструкции. Представленные результаты позволяют заключить, что исследуемые белки, включаясь в метаболические события, могут выступать в качестве агентов, способных протектировать клетки нервной ткани от повреждающего действия ионов аммония.

ОСОБЕННОСТИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ УСЛОВНОГО РЕФЛЕКСА КРЫС ПОСЛЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ АППЛИКАЦИИ ТРИПСИНА ИЛИ КОНТРИКАЛА

Миронова Г.П., Стрижак И.В.

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: skypasht@mail.ru

Известно, что ключевую роль в процессах запоминания играют протеолитические ферменты и функционирование «системы протеазы – ингибиторы протеаз». При изменении функционального состояния организма, например, при стрессе, повреждении тканей, развитии воспалительного процесса нарушаются и механизмы запоминания и забывания. В последнее время помимо природных протеаз и их ингибиторов активно изучаются свойства синтетических аналогов. В клинической практике применяется целый ряд синтетических ингибиторов протеаз, таких как контрикал, гордокс, тразилол и др. Все эти препараты имеют один активный центр, связывающий сериновые протеазы (трипсин, химотрипсин, калликреин или тромбин). Отмечено, что терапевтический эффект интраназальной аппликации ряда лекарственных субстанций, применяемых перорально, внутривенно, внутрибрюшинно и т.д. может оказаться иным. Вомероназальная область функционально связана с лимбической системой мозга. Поэтому в настоящей работе мы проводили анализ влияния трипсина и контрикала при их интраназальном введении на воспроизведение и угасание условного рефлекса избегания у экспериментальных животных с целью коррекции процессов запоминания.

Исследования проводили на белых крысах (n=18) массой 250-270 г, у которых в течение 5-6 дней вырабатывали условный рефлекс избегания на световой раздражитель с отрицательным подкреплением (электрический стимул 8-10 мкА, 1-2 сек) в челночной камере по методике Я. Буреша и др. (1991). Измеряли латентный период реакции избегания (ЛПРИ) до, через 30 мин и 2 ч после интраназальной аппликации на слизистую оболочку носа 5 мкл 0.25% раствора трипсина (Trypsin - EDTA solution, Sigma, Германия – n=6), 5 мкл (5 Ед) контрикала (порошковые инъекции 10000 ЕД, АВД. фарма ГмбХ и Ко.КГ, Германия– n=6) или эквивалентного объема раствора 0.9% NaCl (контроль – n=6). ЛПРИ оценивали на 2, 3, 7, 10, 14, 20, 25, и 30-й дни после аппликации растворов.

В первые часы после интраназальной аппликации исследуемых растворов у всех экспериментальных животных происходит угнетение рефлекса избегания (см. рисунок). У контрольных крыс условный рефлекс восстанавливается на 2-3-й день и стабилен до начала процесса естественного угасания рефлекса (20-21 день). После интраназальной аппликации трипсина, условный рефлекс восстанавливается только на 7-й день наблюдения и сохраняется до 30 дня. Что свидетельствует о торможении процесса естественного угасания условного рефлекса.

При регистрации ЛПРИ на протяжении двух–четырех недель после аппликации контрикала выявлено стойкое угнетение условного рефлекса.

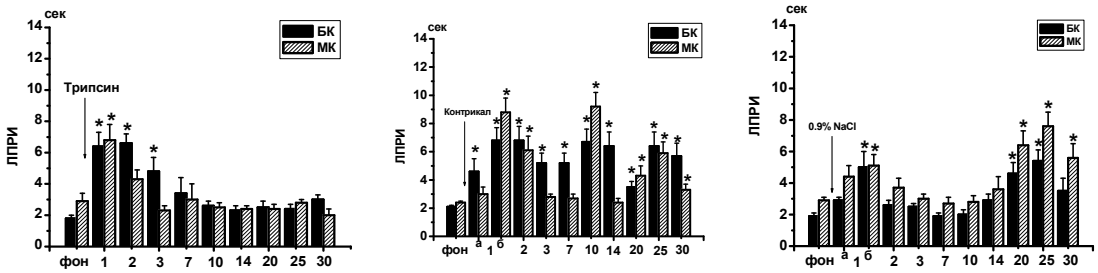


Рис. Динамика изменения латентного периода реакции избегания (ЛПРИ) (сек) у крыс в течение 30 дней после однократной интраназальной аппликации 0.25% трипсина, контрикала и раствора 0.9% NaCl.
Обозначения: фон – ЛПРИ до аппликации препаратов; темные столбики – ЛПРИ при переходе крыс из большой камеры в малую (БК); заштрихованные столбики – при переходе крыс из малой камеры в большую (МК); стрелкой указан момент введения препаратов; *- P< 0.05; а – через 25-30 мин, б – через 1.5-2 ч, по оси абсцисс цифрами 1– 30 указаны дни измерения ЛПРИ после аппликации препаратов

Данные, полученные в эксперименте, позволяют предположить о возможности коррекции когнитивных функций посредством интраназальной аппликации сериновых протеаз или их ингибиторов.

АТРОПИН И ПИЛОКАРПИН КАК ВОЗМОЖНЫЕ ЭФФЕКТОРЫ ПРОТЕОЛИЗА

Никандров В.Н., Мардас Д.К., Полукошко Е.Ф.

Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
e-mail: nikandrov@fizio.bas-net.by

Фармакологическая регуляция процессов протеолиза как одного из ведущих механизмов патогенеза многочисленных заболеваний остается проблемой далекой от решения. Более того, о действии используемых в настоящее время разнообразных фармацевтических препаратов на реакции протеолиза имеются лишь скудные сведения.

Ранее на органотипических культурах краниального шейного ганглия и узловидного ганглия блуждающего нерва показано, что добавление М-холинергических соединений – атропина и пилокарпина способно изменять казеинолитическую активность. В присутствии трипсина добавление к культурам симпатического или узловидного ганглия атропина практически не влияло на интенсивность расщепления казеина культуральной жидкостью ганглиев. Воздействие же пилокарпина сопровождалось нарастанием казеинолитической активности в сравнении с таковой трипсина и через 3 и через 20 ч: для краниального шейного ганглия на 26 и 67% соответственно, а для узловидного ганглия – на 82 и 242% соответственно [1].

Цель настоящей работы – раскрыть особенности воздействия атропина и пилокарпина на казеинолитическую активность гомогенатов печени крысы в присутствии питательной среды ДМЕМ, телячьей эмбриональной сыворотки крови, а также трипсина.

Определение казеинолитической активности проведено методом лизиса казеина в тонком слое агарового геля [2]. Гомогенаты печени готовили на 0,15 М растворе хлорида натрия.

Установлено, что питательная среда, сыворотка крови или гомогенат печени сами по себе не обладали казеинолитической активностью – зон расщепления казеина не обнаруживали ни через 3 ни через 20 ч. Добавление атропина или пилокарпина к гомогенатам печени в концентрациях, описанных нами ранее [1], не вело к проявлению протеолиза.

Вместе тем, казеинолитическая активность смеси трипсин+ ДМЕМ+телячья сыворотка снижалась в сравнении с таковой трипсина на 19–33%, что может быть обусловлено присутствием в питательной среде и сыворотке субстанций ингибиторного плана. Добавление же в такую систему атропина вызвало увеличение протеолитической активности до уровня одного трипсина. Введение в указанную систему пилокарпина заметно увеличило интенсивность расщепления казеина в сравнении с чистым трипсином на 44–65%, а в сравнении со смесью трипсин+ ДМЕМ+телячья сыворотка – на 78–145%. Следовательно, оба холинергических препарата способны снимать действие ингибиторов сыворотки крови на активность трипсина. Но только пилокарпин вызывает, по-видимому, и активацию протеиназы.

Гомогенат печени угнетал казеинолитическую активность трипсина, что также может свидетельствовать о присутствии белков-ингибиторов, биосинтез которых реализуется в печеночной клетке. Следует отметить, что внесение в систему трипсин+гомогенат печени атропина или пилокарпина не вызвало роста казеинолитической активности. Пилокарпин (но не атропин) способствовал увеличению таковой в системе трипсин+ ДМЕМ+телячья сыворотка+гомогенат печени до уровня чистого трипсина лишь через 20 ч.

Следовательно, атропин и пилокарпин способны изменять интенсивность расщепления казеина трипсином в присутствии источников протеолиз-ингибиторных субстанций. Как правило, действие последних может быть уменьшено или снято. Однако наблюдаются и ситуации, когда пилокарпин вызывал значительное увеличение расщепления казеина.

Настоящие исследования выполнены на достаточно сложных системах. Выяснение же механизма подобного действия м-холиномиметических препаратов требует проведения дальнейших исследований на более простых системах, с использованием иных белков-субстратов и других типов протеолитических реакций. Однако, по нашему мнению, подобная способность данных фармацевтических препаратов должна быть учтена при назначении их в лечебных целях. Кроме того, полученные материалы достаточно хорошо иллюстрируют справедливость постановки вопроса о действии фармацевтических препаратов на звенья протеолиза и последствия такого воздействия.

Литература:

1. *В.Н. Никандров, Д.К. Мардас, Е.Ф Полукошко* // Влияние атропина и пилокарпина на активность компонентов протеолиза в органотипических культурах вегетативных ганглиев - Новости медико-биол. наук, 2010, № 4, с. 141–146.
2. *Н.С. Пыжова, В.Н. Никандров* // Влияние биогенных фосфатов на расщепление белков протеиназами и функцию активаторов плазминогена – Биоорган. химия, 2008, т. 34, № 3, с. 382–391.

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА ЭМОДОЛ ДЛЯ КУПИРОВАНИЯ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОЙ БОЛИ У ТРАВМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Чемирис А.Й., Кожемяка М.А.

Запорожский государственный медицинский университет, Запорожья, Украина

Более 75% пациентов в раннем послеоперационном периоде испытывают боль средней и значительной степени интенсивности. В связи с этим особенно актуальным является вопрос выбора современных безопасных медикаментозных препаратов для лечения боли в послеоперационном периоде. Для данной цели широко используются наркотические анальгетики, такие как морфин, омнопон, промедол и др. Обладая выраженным обезболивающим эффектом эти препараты также имеют и большое количество побочных эффектов. В связи с этим монотерапия опиоидами в купировании послеоперационной боли не может являться эталоном. При наличии умеренной или сильной боли у больных в послеоперационном периоде патогенетически обоснованным является применение группы нестероидных противовоспалительных средств (НПВС). НПВС обладают аналгетическими и противовоспалительными свойствами. Особенно эффективны НПВС при внеполосных вмешательствах, в том числе и операциях на костях и суставах верхних и нижних конечностей. Подбор достаточно мощного, относительно безопасного и экономически приемлемого препарата данной группы представляет значительный интерес для каждого оперирующего травматолога. Одним из возможных препаратов выбора может быть препарат Эмодол (Кеторолака трометамин) фирмы Jayson Pharmaceuticals Ltd.

Доказано преимущество анальгетического эффекта и переносимости кеторолака трометамина перед некоторыми другими нестероидными противовоспалительными средствами (диклофенак, ибупрофен) по силе действия и переносимости. Также, значительным преимуществом данного препарата является возможность внутривенного введения для достижения и поддержания необходимого анальгетического эффекта в максимально короткие сроки. Целью данного исследования стало клиническое исследование эффективности и безопасности применения препарата Эмодол для проведения анальгезии в послеоперационном периоде больным травматологического профиля.

На базе клиники травматологии и ортопедии Запорожского государственного медицинского университета в течение 3 месяцев 2010 года было проведено клиническое исследование эффективности и безопасности препарата Эмодол для купирования раннего послеоперационного болевого синдрома у 42 больных. Больным проводился экстра- и интрамедуллярный остеосинтез диафизарных переломов костей бедра или голени (мало- и умеренно травматичные вмешательства с умеренно и значительно выраженным болевым синдромом в послеоперационном периоде). Контрольной группе из 20 пациентов обезболивание проводили в раннем послеоперационном периоде посредством наркотических анальгетиков – раствор омнопона (0,02 внутримышечно) 1-2 раза в сутки в зависимости от выраженности болевого синдрома. Остеосинтез переломов бедра проводился в 8 случаях (40%), остеосинтез переломов костей голени в 12 случаях (60%). Исследуемую группу составили 22 пациента. Остеосинтез переломов бедра проводился в 9 случаях (40,9%), остеосинтез переломов костей голени в 13 случаях (59,1%). В послеоперационном периоде больные данной группы получали препарат Эмодол 30 мг внутривенно 2 раза в день на протяжении 2-х дней и раствор омнопона (0,02 внутримышечно) при выраженном болевом синдроме.

При оценке клинической эффективности препарата Эмодол по пятибалльной шкале в исследуемой группе установлено, что отсутствие эффекта не отметил ни один пациент. Выраженный положительный эффект от введения препарата наблюдался в 90,9% случаев. В контрольной группе отсутствие эффекта также не отметил ни один пациент. Положительный эффект от введения препарата наблюдался в 95% случаев. По 10-бальной визуально-аналоговой шкале боли после внутривееного ведения препарата Эмодол пациенты оценили интенсивность болевого синдрома в среднем на уровне 3,3±1,5 бала, после применения наркотических анальгетиков – 3,15±1,7 балла, т.е. эффективность применения Эмодола и наркотических средств находится в соизмеримых пределах.

Максимальный эффект от применения Эмодола был отмечен у больных после менее травматических операций (остеосинтез костей голени). Отдельно стоит отметить более раннее наступление обезболивающего эффекта при внутривенном введении Эмодола в сравнении с внутримышечным введением наркотических анальгетиков.

При применении препарата Эмодол для обезболивания в послеоперационном периоде не были выявлены какие-либо осложнения. В отличие от наркотических анальгетиков Эмодол не угнетает дыхательный центр и в отличие от морфина не вызывает роста pCO2. Эмодол не влияет на показатели состояния сердечной мышцы и не вызывает гемодинамических нарушений, не влияет на психомоторные функции в отличие от других анальгетиков центрального действия — морфина, петидина и бупренорфина. Применение препарата Эмодол после операций остеосинтеза костей голени и бедра при болях умеренной и средней интенсивности позволило избежать применения наркотических анальгетиков и добиться выраженного обезболивающего эффекта. При болевом синдроме значительной интенсивности удалось минимизировать дозу вводимых наркотических анальгетиков, а также удалось уменьшить и сроки использования наркотических анальгетиков, тем самым минимизировав проявление их побочных эффектов. Следовательно, применение препарата ЭМОДОЛ является эффективным и безопасным препаратом для обезболивания пациентов в послеоперационном периоде.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КУПИРОВАНИЯ ОСТРОЙ БОЛИ В НИЖНЕЙ ЧАСТИ СПИНЫ 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.Щупика, Киев, Украина

В последнее время резко увеличилось число больных с различными формами дорсопатий. К дорсопатиям отнесены проявления патологии позвоночника на всех его уровнях. Однако наиболее часто встречающийся вариантом дорсопатий на сегодняшний день – синдром боли в нижней части спины (БНС) - боль, локализованная между 12 парой ребер и ягодичными складками. Данный синдром достиг уровня эпидемии в странах с высоким экономическим уровнем, что обусловлено возрастающими нагрузками на опорно-двигательный аппарат человека, что приводит к дегенеративно-дистрофическим изменениям позвоночника, сопровождающимся болевым синдромом.

В экспериментальных и клинических условиях выявлен анальгетический эффект витаминов группы В, а именно: тиамина (В1), пиридоксина (В6), цианкобаламина (В12). Большие дозы витаминов данной группы при их комбинации уменьшают ноцицептивную активность нейронов. Более выраженное уменьшение ноцицептивной активности, а следовательно и уменьшение боли, наблюдается при сочетании витаминов группы В с нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП), в частности диклофенаком.

В связи с этим было проведено исследование целью, которого явилось изучить эффективность и переносимость диклофенака натрия с витаминами группы В у больных с БНС в сравнении с монотерапией диклофенаком.

В исследование было включено 60 пациентов с первичным острым БНС в возрасте от 23 до 75 лет. Всем проведены рентгенографическое исследование пояснично-крестцового отдела позвоночника, общий анализ крови, клинический анализ мочи. С целью верификации диагноза использовали диагностические критерии, предложенные американским колледжем ревматологов (Нью-Йоркские критерии).

Все пациенты были разделены на 2 группы по 30 человек в каждой: I группа (экспериментальная) получала МЕГАФЕН ПЛЮС (диклофенак натрия 75 мг с лидокаином 20 мг) и НЕРВИПЛЕКС (комплекс витаминов группы В - тиамина гидрохлорида (В1) 100мг, пиридоксина гидрохлорида (В6) 50 мг, цианкобаламина (В12) 1000мкг) в/м 1 раз в сутки 3 дня (препараты фирмы Jayson Pharmacuticals LTD.); II группа (контрольная) получала только МЕГАФЕН ПЛЮС (диклофенак натрия 75 мг с лидокаином 20 мг) в/м 1 раз в сутки в течении 3-х дней (препарат фирмы Jayson Pharmacuticals Ltd.).

Оценка эффективности терапии проводилась с использованием визуальной аналоговой шкалы (ВАШ) боли до и после лечения и Мак-Гилловский болевой опросник. ВАШ использовалась для оценки: 1) боли в состоянии покоя; 2) индуцированной боли - пациент лежа на спине, руки вытянуты вдоль тела, медленно поднимал выпрямленную ногу до появления иррадиирущей боли в зоне L5-S1. Фиксировался уровень (угол) поднятия ноги, при котором возникала боль. Результаты опроса использовались не только для оценки боли, но и психоэмоционального состояния пациента.

В результате проведенного исследования было установлено, что 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($P<0,05$), чем в контрольной группой.

Говоря о психоэмоциональном состоянии пациентов после лечения, следует отметить, что оно у больных I группы значительно улучшалось по сравнению с пациентами II группы ($P<0,05$) после лечения.

В процессе исследования также оценивалось изменение интенсивности боли в зависимости от степени ее выраженности (сильная, умеренная). У пациентов I и II группы определялась сильная и умеренная боль (по ВАШ). 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.

В процессе исследования была отмечена хорошая переносимость препаратов МЕГАФЕН ПЛЮС (диклофенака с лидокаином) и НЕРВИПЛЕКСА (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, отсутствие аллергических реакций и отсутствие болезненности в месте инъекции.

Как показало проведенное исследование для купирования острой БНС эффективны и комбинация препаратов МЕГАФЕН ПЛЮС с НЕРВИПЛЕКСОМ, и монотерапия МЕГАФЕНОМ ПЛЮС.

Однако, применение МЕГАФЕН ПЛЮС совместно с НЕРВИПЛЕКСОМ позволили получить более значительное уменьшение индуцированной боли и более значительное улучшение психоэмоционального состояния, а значит улучшения качества жизни исследуемых пациентов, что свидетельствует об увеличении двигательной активности пациентов, а следовательно и об улучшении их трудоспособности.

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.

ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ГЕРОНТОЛОГИИ

Береговая Т.В.

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

Предупреждение старения – древнейшая мечта человечества. История полна примеров безрезультативного поиска эликсиров молодости. Их создание возможно только на основе познания механизмов старения. Поэтому, прежде всего, в докладе будут освещены основные теории старения: молекулярно-генетические (теломерная теория, онтогенетическая теория, адаптационно-регуляторная теория) и стохастические (теория свободных радикалов, гипотеза “старения по ошибке”, теория апоптоза), термодинамическая и иммунологическая теории старения.

Учитывая тот факт, что видовой предел жизни человека составляет 110-120 лет, несомненно мы можем констатировать: старение человека в современном мире происходит по преждевременному (ускоренному) типу. Следующая часть доклада будет посвящена факторам риска преждевременного старения: эндогенным (болезни, наследственность) и экзогенным (гиподинамия, психические стрессы, избыточное питание, вредные привычки, загрязнение окружающей среды, влияние ионизирующей радиации, социальная незащищенность и т.д.) .

Исходя из того, что важнейшей задачей современной геронтологии является борьба с преждевременным старением, основная часть доклада будет посвящена геропротекторам. Современные гериатрические препараты – это биологически активные вещества широкого спектра действия. Их применение направлено на коррекцию энергетических процессов, усиление компенсаторных, адаптационных и регуляторных механизмов. Применение тех или иных биологически активных веществ в качестве геропротекторов основано на различных теориях старения, поэтому геропротекторы обладают различным механизмом действия. Будет представлен обзор биологически активных веществ, применяемых в качестве геропротекторов.

И, наконец, будут представлены результаты исследований, проводимых в Учебно-исследовательском центре «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, посвященных биологически активным веществам, которые могут быть перспективными геропротекторами.

Учитывая современные данные о нарушении микрофлоры кишечника с возрастом, а также свободно-радикальную и иммунологические теории старения, мы сочли целесообразным исследовать влияние курсового приема мультипробиотика «Симбитер® ацидофильный» концентрированный на физиологические и биохимические параметры функционирования организма крыс в различные возрастные периоды. Выбор мультипробиотика «Симбитер® ацидофильный» концентрированный в качестве средства, нормализующего микробиоценоз кишечника, обусловлен не только его уникальным многокомпонентным составом, но и доказанными ранее свойствами нормализовать про-/антиоксидантный баланс и усиливать иммунитет.

Фундаментальные и прикладные аспекты применения биологически активных веществ: механизмы регуляции биологических процессов

Fundamental and Applied Problems of Application of Bioactive Substances: Mechanisms of Regulation of Biological Processes

Спонсор Конференции

BIO-RAD

BIO-RAD Laboratories

Обладнання і реагенти для дослідницьких, медичних та промислових лабораторій

Компанія BIO-RAD (США) є найбільшим світовим виробником лабораторного та аналітичного обладнання. На сьогодні BIO-RAD представляє широку гамму обладнання для дослідницьких та промислових лабораторій:

- **ПЛР-ампліфікатори CFX96 Real Time**
- **Обладнання та реагенти для геном них та протеомних досліджень**
- **Обладнання для рідинної хроматографії**
- **Обладнання, реагенти і витратні матеріали для електрофорезу та блоттінгу**
- **Системи анализу зображення. Документуючі системи. Програмне забеспечення**

За додатковою інформацією щодо технічних можливостей та вартості продукції компанії BIO-RAD просимо Вас звертатися до регіонального представництва компанії в Україні за адресою:

Київ, 02160, проспект Возз'єднання 7а, оф. 315
Тел.: (050) 446-21-13, (050) 448-34-56
e-mail: office@bio-rad.com.ua
www.bio-rad.com

ВПЛИВ КАЛІКСАРЕНУ С-107 НА КІНЕТИКУ ЗАЛЕЖНОСТІ Na^+,K^+-АТР-азної АКТИВНОСТІ ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ КЛІТИН МІОМЕТРІЯ ВІД УАБАЇНУ

Векліч Т.О., Шкрабак О.А.

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ
e-mail: veklich@biochem.kiev.ua

В останній час все більше уваги приділяється каліксаренам – макроциклічним сполукам, які отримують циклоконденсацією пара-заміщених фенолів і формальдегіду. Каліксаренові матриці мають низьку токсичність, вони створюються за допомогою відносно некоштовних, але ефективних методів синтезу. Ці сполуки легко проникають через плазматичну мембрану і є досить перспективними для створення нових високоефективних селективних інгібіторів та активаторів внутрішньоклітинних біохімічних процесів, оскільки здатні оборотно модифікувати функціональну активність окремих протеїнів [1].

У попередніх дослідах, було знайдено, що каліксарен **С-107** (5,17-ди(фосфоно-2-піридил-метил)аміно-11,23-ди-*трет*-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]-арен, рис. 1) здатний ефективно інгібувати активність Na^+,K^+-АТР-ази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин матки [2]. Проте властивості та механізм інгібувальної дії зазначеного каліксарену на Na^+,K^+-АТР-азну активність не з'ясовано. Тому в експериментах, виконаних на суспензії плазматичних мембран клітин міометрія, ми досліджували вплив каліксарену **С-107** на кінетичні параметри дії класичного інгібітора Na^+,K^+-АТР-ази уабаїну.

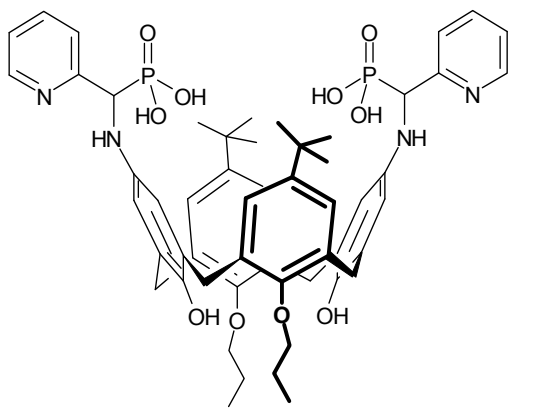


Рис. 1. Каліксарен С-107.

"Загальну" Mg^{2+},Na^+,K^+-АТРазну активність визначали у фракції плазматичних мембран клітин міометрія, при 37° С у стандартному середовищі (об`єм - 0,4 мл), яке містило (мМ): 1 АТР, 3 $MgCl_2$, 125 NaCl, 25 KCl, 1 ЕГТА, 20 Hepes-tris-буфер (pH 7,4), 1 NaN_3, 0,1 мкМ тапсигаргін і 0,1% дигітонін. Кількість білку мембранної фракції в пробі – 30 мкг. Час інкубації - 4 хвилини. Ензиматичну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти (50 мкл) суспензії плазматичних мембран, а зупиняли - додаванням до інкубаційної суміші 1 мл так званого "стоп"-розчину наступного складу: 1,5 М натрій оцтовокислий, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХУ, pH 4,3 (8^0 С). Mg^{2+}-АТРазну активність визначали в тому ж середовищі інкубації, але в присутності 1 мМ уабаїну. "Уабаїнчутливу" Na^+,K^+-АТР-азну активність розраховували по різниці між величинами "загальної" АТР-азної і Mg^{2+}-АТР-азної активностями. Каліксарен **С-107** був синтезований в Інституті органічної хімії НАНУ під керівництвом член-кор. НАНУ В.І. Кальченка.

Ми дослідили вплив каліксарену **С-107** у різних концентраціях (10-100 нМ) на залежність активності Na^+,K^+-АТР-ази від концентрації уабаїну. Показано, що каліксарен **С-107**, інгібуючи активность Na^+,K^+-АТР-ази, призводить до зниження уявної константа інгібування ($I_{0,5}$) Na^+,K^+-АТР-ази уабаїном з 26,9 ± 1,3 мкМ до 10,9 ± 0,6 мкМ. Значення коефіцієнту Хілла при цьому не змінюється ($n_H \simeq 0,5$). Таким чином кооперативність інгібувальної дії уабаїну не залежить від концентрації каліксарену **С-107**, залишаючись від'ємною ($n_H < 1$) в широкому діапазоні концентрацій каліксарену.

На відміну від цього, використання різних концентрацій уабаїну не впливає на константу гальмування $I_{0,5}$ і коефіцієнт Хілла n_H для каліксарену **С-107**. Значення коефіцієнту Хілла n_H = 1,4-1,8, що відповідає позитивній кооперативності ензиматичної реакції по каліксарену **С-107**. Різниця у значеннях коефіцієнтів кооперативності дії каліксарену **С-107** та уабаїну вказує на різні механізми інгібування Na^+,K^+-АТРази даними речовинами.

Отже, можна стверджувати, що у присутності каліксарену **С-107** збільшується спорідненість Na^+,K^+-АТР-ази ПМ клітин міометрія до уабаїну. Таким чином можна припустити, що збільшення афінітету Na^+,K^+-АТР-ази до уабаїну викликане стимулюючим впливом каліксарену на взаємодію "уабаїн – уабаїновий рецептор".

В практичному аспекті каліксарен **С-107** може бути корисним у біохімічній мембранології у якості ефективного інгібітора Na^+,K^+-АТРази.

Автори висловлюють подяку член-кор. НАНУ В.І.Кальченку (Інститут органічної хімії НАНУ) за люб'язно наданий каліксарен та член-кор. НАНУ С.О.Костеріну (Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАНУ) за цінні рекомендації під час обговорення експериментальних результатів.

Література:

1. *Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V. I.* Calixarenes in bio-medical researches // Current Medicinal Chemistry. - 2009. – Vol. 16, N 13. – P. 1630-1655.
2. *Векліч Т.О., Костерін С.О., Родік Р.В. та ін.* // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 1. – С. 62–78.

THE EFFECT OF CALIXARENE C-107 ON KINETIC CHARACTERISTICS OF OUABAIN ACTION ON NA^+,K^+-ATPase ACTIVITY OF UTERUS MYOCYTE PLASMA MEMBRANE

Veklich T.S., Shkrabak O.A.

O.V. Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: veklich@biochem.kiev.ua

By now a great attention of scientists is paid to calixarenes as original molecular platforms which are perspective for designing of compounds capable to influence on biochemical processes. Calixarenes are macrocyclic compounds which are obtained by cyclocondensation of para-substituted phenol and formaldehyde. Some calixarenes posses bactericidal, antiviral, antitumoral, antithrombotic activity, they practically have no toxic action on cells [1].

In our previous investigation carried out on the suspension of myometrium cell plasma membranes we found that calixarene **C-107** (5,17-diamino(2-pyridyl)methylphosphono-11,23-di-tret-butyl-26,28-dihydroxy-25,27-dipropoxycalix[4]arene, fig. 1) effectively inhibited Na^+,K^+-ATPase and did not practically influence on activity of another membrane-bound Ca^{2+}-independent Mg^{2+}-dependent enzymatic system – "basal" ouabainresistant Mg^{2+}-ATPase [2]. Considering further development conception about mechanisms of inhibition by calixarene **C-107** on the plasma membrane Na^+,K^+-ATPase of uterus cells we have more thoroughly investigated influence of this compound on kinetic parameters of oubain (conventional inhibitor of Na^+,K^+-ATPase) action on the Na^+,K^+-ATPase activity.

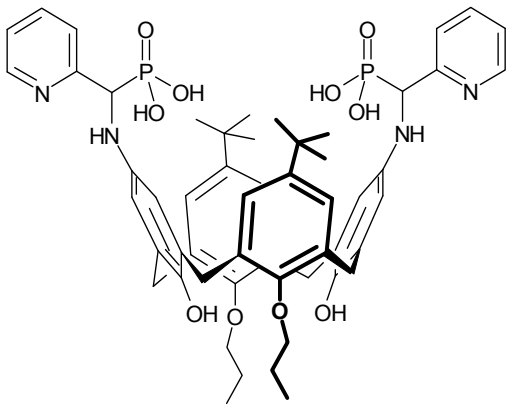


Fig. 1. Calixarene **C-107**.

General Mg^{2+},Na^+,K^+-ATPase activity was determined in the myometrium plasma membrane fraction at 37 °C in the standard incubation medium (volume – 0.4 ml), which contained (mM): 1 ATP, 3 $MgCl_2$, 125 NaCl, 25 KCl, 1 EGTA, 20 Hepes-tris-buffer (pH 7.4), 1 NaN_3, 0.1 μM thapsigargin and 0.1 % digitonin. The protein quantity was 30 μg, the incubation time was 4 min. The enzymatic reaction was initiated by adding of 50 μl of plasma membrane suspension in the incubation medium and stopped by 1 ml of "stop"-solution which contained 1.5 M sodium acetate, 3.7 % formaldehyde, 14 % ethanol, 5 % trichloroacetic acid (pH 4.3 at 8 °C). "Basal" Mg^{2+}-ATPase activity was assayed in the same incubation medium, but in the presence of 1 mM ouabain. The ouabain-sensitive Na^+,K^+-ATPase activity was calculated as the difference between magnitudes of general ATPase and Mg^{2+}-ATPase activities. Calixarene **C-107** was synthesized in Institute of Organic Chemistry of NASU by guidance of corresponding member of NASU V.I. Kalchenko.

We investigated the influence of calixarene **C-107** with different concentration (10-100 nM) on dependence of Na^+,K^+-ATPase activity on ouabain concentration. It has been shown that the calixarene **C-107** inhibiting Na^+,K^+-ATPase caused the decrease of the apparent constant of inhibition ($I_{0.5}$) of Na^+,K^+-ATPase by ouabain from 26.9 ± 1.3 μM to 10.9 ± 0.6 μM. The Hill coefficient n_H did not vary ($n_H \simeq 0.5$) in the presence of calixarene **C-107**, that is cooperativity of inhibition by ouabain was negative and did not depend on concentration of calixarene **C-107**

On the othe hand, ouabain with different concentration did not influence on the Hill coefficient and the apparent constant of inhibition ($I_{0.5}$) by calixarene **C-107**. The magnitude of Hill coefficient n_H was 1.4-1.8, that is cooperativity of inhibition by calixarene **C-107** was positive. The difference of cooperativity coefficient magnitudes of calixarene **C-107** and ouabain is the evidence of different mechanisms of inhibition of Na^+,K^+-ATPase by these compounds.

Thus, we can conclude that calixarene **C-107** increases the affinity of the enzyme towards ouabain, but the ouabain itself doesn't influence on the affinity of Na^+,K^+-ATPase to calixarene **C-107**. Perhaps, the affinity increase of the Na^+,K^+-ATPase to ouabain was caused by stimulation of calixarene on interaction "ouabain □ ouabain receptor".

Calixarene **C-107** can be useful in practice as effective inhibitor of Na^+,K^+-ATPase.

We are thankful to corresponding member of NASU V.I. Kalchenko (Institute of Organic Chemistry, NASU) for kindly given calixarene and corresponding member of NASU S.O. Kosterin (O.V. Palladin Institute of Biochemistry, NASU) for valued advice during discussion of our investigation results.

References:

1. *Rodik R.V., Boyko V.I., Kalchenko V. I.* Calixarenes in bio-medical researches // Current Medicinal Chemistry. - 2009. – Vol. 16, N 13. – P. 1630-1655.
2. *Veklich T.O., Kosterin S.O., Rodic R.V. at al.* Effect of calixarene-phosphonic acid on Na^+, K^+-ATPase activity in plasma // The Ukrainian biochemical journal. – 2006. – V.**78**, N 1. – P. 62–78.

РОЛЬ N-КОНЦЕВОГО ФРАГМЕНТА НОЦИЦЕПТИНА В ФОРМИРОВАНИИ ЗАЩИТНОГО ПОВЕДЕНИЯ И ТЕРМОРЕГУЛЯЦИИ АМЕРИКАНСКОГО ТАРАКАНА *PERIPLANETA AMERICANA* В ТЕСТАХ“ ОТКРЫТОГО ПОЛЯ”, “ON-OFF” И “ГОРЯЧЕЙ КАМЕРЫ’

Грицай О.Б., Дубынин В.А.

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия
e-mail: gokio1996@ mail.ru

Сравнительно недавно открытый эндогенный пептид позвоночных ноцицептин (орфанин FQ) представляет собой лиганд опиоидноподобного рецептора ORL1. Как он сам, так и его аналоги в зависимости от места введения и дозы могу вызывать как усиление боли, так и анальгетический или анксиолитический эффект. В нашей работе впервые было показана важная роль N-концевого фрагмента ноцицептина (AcOH-Phe-Gly-Gly-Phe–NH2) в регуляции как уровня тревожности насекомых, так и терморегуляции на примере поведения американского таракана в тестах “открытое поле“ ,”on-off” и “горячая камера“.

В нашем случае “открытое поле” представляет собой цилиндр диаметром 30 и высотой 10 см, дно которого расчерчено на отдельные сектора. Показателем активности служила величина пробега (количество секторов за 5 мин наблюдения, произведенного через 0, 30, 60, 90 120 мин после инъекции препарата). Тест ”oh-off”был проведен также в открытом поле по следующей схеме: насекомые экспонировались 5 мин при красном свете, 5 мин при ярком свете, 5 мин снова при красном свете. В исследовании с использованием метода “горячей камеры“, имеющей t=48°C, оценку действия препарата производили по изменению времени пребывания в ней насекомого по сравнению с контролем. Ноцицептин вводили микроинъектором в прототоракс таракана в дозах 50, 100 и 200 мкг/г (либо физраствор в контроле). Насекомое, оказавшись в незнакомой обстановке “открытого поля”, испытывает своего рода стресс. В подобных случаях ориентация насекомых осуществляется по принципу фоботаксиса, основанного в первую очередь на ортокинезе, который выражается в повышенной скорости движения и смене направления движения. После введения препарата происходит значимое снижение локомоторной активности на 48-80% (100 мкг/г), по отношению к контролю, начиная с 60 мин наблюдений, и на 57-70% (200 мкг/г), начиная с 30 мин наблюдения, соответственно ($p< 0,001$-$0,03$). Препарат в дозе 50 мкг/г не оказывал значимого действия. Включение света после инъекции фрагмента ноцицептина в дозах 100 и 200 мкг/г повышало величину пробега на 29-52% и 35-48,5%, соответственно ($p<0,001$-$0,02$). Время пребывания в горячей камере на фоне действия фрагмента ноцицептина значимо возрастало: на 130-190% (100 мкг/г), начиная с 90 мин наблюдения ($p<0.01$-0.008), и на 160-230% (200 мкг/г), начиная с 30 мин наблюдения, что доказывает сходное с анальгетическими проявлениями у позвоночных действие препарата.

Представленные результаты могут свидетельствовать также о анксиогенном влиянии фрагмента ноцицептина на уровень тревожности таракана P. americana, что соответствует нашим предыдущим исследованиям о влиянии опиоидных пептидов на формирование защитного поведения насекомых [1,2].

Литература

1. *О.Б .Грицай, В.А. Дубынин, Ж.Д.Беспалова, В.Э. Пелипенко .* // Влияние ряда экзорфинов и эндорфинов на реакцию избегания таракана Periplaneta americana в условиях повышенной температуры – Ж. эвол. биохим. и физиол.,2009, т.45, №4, с. 391-396
2. *О.Б .Грицай, В.Э. Пелипенко, Ж.Д. Беспалова В.А, Дубынин.* // Роль опиоидных пептидов пищевого происхождения в регуляции термочувствительности таракана - Вестн. Моск. ун-та. Сер.16. Биология, 2008, т.63, №63, p.150-155

THE ROLE OF THE N-END FRAGMENT OF NOCICEPTIN IN FORMING THE AMERICAN COCKROACH *PERIPLANETA AMERICANA* DEFENSIVE BEHAVIOUR AND THERMOREGULATION IN THE COURSE OF 'OPEN FIELD', 'ON-OFF' AND 'HOT CHAMBER' TESTS

Gritsay O.B., Dubynin V.A.

Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, Russia
e-mail: gokio1996@ mail.ru

Nociceptin (FQ-orphanin), rather lately discovered endogenous peptide of vertebrates, is a ligand of opiat-like ORL1-receptor. Like its analogues, it can provoke as increasing of pain, also an analgetic or an anxiolytic effect depending on the point of the injection and the dose. The significant role of the N-end fragment of nociceptin (AcOH-Phe-Gly-Gly-Phe–NH2) for regulation of insect anxiety level and thermoregulation has been first demonstrated in our research by the example of the American cockroach behaviour in 'open field', 'on-off' and 'hot chamber' tests.

Our 'open field' is represented by cylinder of 30 cm in diameter and of 10 cm in height with the sectored floor. The run (number of sectors crossed by the cockroach within 5 minutes just after the injection of the stuff, also 30, 60, 90 and 120 minutes later) served us as the indicator of activity. 'On-off' test was carried out in the same cylinder according to the following scheme: the insects were exposed to red light for 5 min, then to bright light for 5 min and then to red light for 5 min once more.

In the 'hot chamber' tests (t =48°C) the estimation of the stuff effect was made on the ground of change of duration of insect stay in the chamber concerning to the control. Nociceptin was brought in a cockroach prothorax by microinjector in such doses as 50, 100 and 200 µg/g (using a physiological solution as a control). The insect being situated in strange conditions of 'open field' feels a kind of stress expressing in increasing in locomotor activity also in changing of moving direction. After the stuff injection the significant decrease of the indicator with respect to the control took place: 48–80% (100 µg/g) after 60 min of observation, 57–70% (200 µg/g), after 30 min of observation respectively (p< 0,001–0,03). The dose of 50 µg/g did not lead to a significant effect. Turning on the light after the injection of the nociceptin fragment (100 and 200 µg/g) led to the increasing of the indicator by 29–52% and 35–48,5% respectively (p<0,001–0,02). The duration of stay in hot chamber, while the nociceptin fragment acted, increased significantly: 130–190% (100 µg/g), after 90 min of observation (p<0.01–0.008), 160–230% (200 µg/g), after 30 min of observation; that demonstrated the analgetic effect of the stuff. The presented results also can indicate the anxiogenic action of nociceptin fragment on *P.americana* anxiety level. They corresponds with our previous research on the opioid peptide effect on forming of insect defensive behaviour [1,2].

Referents:

1. *O.B. Gritsai, V.A. Dubynin, J.D. Bespalova, V.E. Pilipenko.* // Influence of some exorphins and endorphins on the escape response of cockroaches Periplaneta americana under increased temperature conditions – J. evol. biochem. and physiol. 2009, Vol.45, №4, p. 391-396
2. *O.B. Gritzay, V.E. Pilipenko, J. D. Bespalova, V.A. Dubynin.* // Role of the food-derived opioid peptides in the control of the thermosensitiveness of the cockroach Periplaneta americana – Moscow University Biological Sciences Bulletin, 2008, Vol.63, №.63, p.150-155.

УГНЕТЕНИЕ СИНАПТИЧЕКОГО ТОРМОЖЕНИЯ ГЛАДКИХ МЫШЦ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА ПИРИДОКСАЛЬ-5′-ФОСФАТОМ

Груша М.М., Романенко А.В.

Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольця, Киев, Украина
e-mail: g_mykhaylo@meta.ua

Одной из фундаментальных проблем современной гастроэнтерологии является регуляция моторики кишечника. Считают, что моторика кишки не только обеспечивает пассаж химуса, но и в значительной мере способна влиять на эффективность процессов пищеварения и всасывания. Регуляцию функциональной активности интестинальных гладких мышц (ГМ) возможно осуществлять через влияния как на возбуждающие, так и на тормозящие звенья вегетативной нервной системы. Данные литературы свидетельствуют в пользу участия в тормозящей синаптической передаче нескольких медиаторов, а на роль одного из основных тормозящих медиаторов в энтеральних ГМ человека претендует аденозинтрифосфат, который взаимодействует с P_2-пуринорецепторами плазматической мембраны интерстициальных клеток Кахаля и гладкомышечных клеток (ГМК). Однако, сейчас из допущенных к клинической практике блокаторов пуринорецепторов имеется лишь клопидогрел – антиагрегант, применяемый для профилактики инфаркта миокарда при стенокардии. В виду отсутствия официнальных фармацевтических средств, способных влиять на синаптическое торможение ентеральных ГМ, важно исследовать те вещества, которые уже применяются в клинической практике и потенциально способны влиять на ГМК стенки кишки. К ним можно отнести фосфорилированную форму витамина B_6 пиридоксаль-5′-фосфат, принимая во внимание, что его синтетическое производное пиридоксальфосфат-6-азофенил-2´,4´-дисульфоновая кислота (PPADS) является блокатором некоторых подсемейств P_2-пуринорецепторов.

Полоски ГМ изолированные из резецированных по медицинским показаниям фрагментов тонкой кишки и толстой кишки человека были исследованы с использованием методики сахарозного мостика. Все исследованные фрагменты были использованы в соответствии с биоэтическими принципами использования тканей человека в фундаментальных научных исследованиях. Указанные фрагменты кишечника были топографически удалены от пораженного участка пищеварительной системы на десять и более сантиметров. Были исследованы 21 полоска ГМК, выделенная из различных участков тонкой кишки и 37 полосок ГМК – толстой кишки человека. Изолированные полоски ГМ инкубировались в растворе Кребса следующего состава (ммоль): NaCl–120,4, KCl–5,9, $NaHCO_3$–15,5, NaH_2PO_4–1,2, $CaCl_2$ – 2,5, $MgCl_2$–1,2, глюкоза–11,5. В условиях электрического раздражения интрамуральных нервных образований в ГМ генерировались тормозящие синаптические потенциалы (ТСП) в виде кратковременной гиперполяризации. Анализировали такие амплитудно-кинетические параметры: латентный период ТСП, амплитуду ТСП, общую длительность ТСП, время нарастания ТСП до половины амплитуды, скорость нарастания ТСП до половины амплитуды, время спада ТСП до половины амплитуды. Исходные значения каждого амплитудно-кинетического параметра ТСП принимались за 100 %.

В экспериментах, проведенных на ГМ различных участков тонкой кишки добавление в раствор Кребса пиридоксаль-5′-фосфата в концентрации $1*10^{-6}$ моль/л приводило к увеличению латентного периода ТСП на 7-10 минуте аппликации до 121±6 % (n=9, p<0,05) и на 17-20 минуте аппликации до 159±27% (n=7, p>0,05) по сравнению с контролем. Добавление в раствор Кребса пиридоксаль-5′-фосфата в концентрации $1*10^{-4}$ моль/л приводило к увеличению латентного периода ТСП на 7-10 минуте до 153±10 % (n=12, p<0,05) и на 17-20 минуте аппликации до 148±15% (n=6, p<0,05) по сравнению с контролем, уменшению амплитуды ТСП, скорости нарастания ТСП до половины амплитуды и времени спада ТСП до половины амплитуды соответственно на 7-10 минуте до 45±5 % (n=14, p<0,05), 47±7 % (n=11, p<0,05) и 78±5 % (n=11, p<0,05), а на 17-20 минуте аппликации до 42±7% (n=9, p<0,05), 63±17% (n=5, p>0,05) и 84±13% (n=5, p>0,05) по сравнению с контролем. Результаты экспериментов, проведенные на ГМ различных участков толстой кишки указывают на способность пиридоксаль-5′-фосфата в концентрациях $1*10^{-8}$-$1*10^{-4}$ моль/л вызывать статистически значимые изменения таких амплитудно-кинетических параметров ТСП: латентного периода, амплитуды, скорости нарастания до половины амплитуды и времени спада до половины амплитуды. Эти изменения были в целом схожими с теми, которые описаны для ГМ тонкой кишки человека.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов указывают на способность эндогенного производного витамина B_6 проявлять свойства блокатора P_2-пуринорецепторов висцеральних гладких мышц человека.

REDUCTION OF SYNAPTIC IHIBITION OF HUMAN INTESTINAL SMOOTH MUSCLES BY PYRIDOXAL-5'-PHOSPHATE

Grusha M.M., Romanenko O.V.

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine
e-mail: g_mykhaylo@meta.ua

One of the fundamental problems of modern gastroenterology is the regulation of motility of the intestine. It is believed that gut motility provides not only the passage of chyme, but also, to a large extent, can influence on the efficiency of the digestion and the absorption processes. Regulation of functional activity of intestinal smooth muscles (SM) may be realized through effects both on excitatory and on inhibitory links to the autonomic nervous system. There are literature data about several neurotransmitters involvement in the inhibitory synaptic transmission and the role of one of the major inhibitory neurotransmitters in the human enteric SM claims adenosine triphosphate, which interacts with the P_2-purinoceptor of plasmalemma of interstitial cells of Cajal and smooth muscle cells (SMC). However, now only clopidogrel, known as a blocker of purinoreceptor and the antiplatelet agent, which is used for prevention of myocardial infarction anginais, is admitted to the clinical practice. As a result of absence of officinal pharmaceuticals capable to influence the intestinal SM synaptic inhibition, the researching of another substances, which are already used in clinical practice and may potentially affect to the SMC of the bowel wall is important. These include the phosphorylated form of vitamin B_6, pyridoxal-5'-phosphate, taking into account that its synthetic derivative pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2´,4´-disulfonic acid (PPADS) is the blocker of some subfamilies of P_2-purinoreceptors.

Strips of SM isolated from resected for medical reasons fragments of the human small intestine and the human colon were investigated using the technique of sucrose-gap. All investigated fragments were treated ethically according to the guiding principles for use of human tissue in the field of basic sciences. The indicated fragments of intestine were topographically separated from the digestive system affected area regions on ten or more centimeters. There were investigated 21 strips SMC, isolated from different parts of the small intestine and 37 strips of SMC, isolated from different parts of the human colon. Isolated SM strips were incubated in Krebs solution of the following composition (mM): NaCl – 120,4, KCl – 5,9, $NaHCO_3$ – 15,5, NaH_2PO_4 – 1,2, $CaCl_2$ – 2,5, $MgCl_2$ – 1,2, glucose – 11,5. Under the conditions of electrical stimulation of intramural nerve structures, which located in the SM, inhibitory synaptic potentials (ISP) in the form of short-term hyperpolarization were generated. We analyzed such ISP parameters: latency, the amplitude, the total duration, the rise time of ISP up to the half of amplitude, the rate of rise of the ISP to the half of amplitude, and ISP decay time to the half of amplitude. The initial values of the evens amplitude and kinetic parameter of the ISP was taken as 100%.

In experiments conducted at SM of different parts of small intestine the adding in a Krebs solution of pyridoxal-5'-phosphate in a concentration of $1*10^{-6}$ mol/l leads at 7-10 minutes of applications the increasing of the value of the latent period of ISP to 121±6% (n=9, p<0,05) and at 17-20 minutes of application – to 159±27% (n=7, p>0,05) compared with control. Adding in a Krebs solution of pyridoxal-5'-phosphate in a concentration of $1*10^{-4}$ mol/l increased the value of the latent period of the ISP at 7-10 minutes of application to 153±10% (n=12, p<0,05) and at 17-20 minutes of application to 148±15% (n=6, p<0,05) compared with control; reduced amplitude of the ISP, the ISP rate of increase to half of amplitude and ISP decay time to the half of amplitude, at 7-10 minutes of application respectively to 45±5% (n=14, p<0,05), 47±7% (n=11, p<0,05) and 78±5% (n=11, p<0,05) and at 17-20 minutes of application respectively to 42±7% (n=9, p<0,05), 63±17% (n=5, p>0,05) and 84±13% (n=5, p>0,05) compared with control. The experiments performed on SM of different parts of the colon indicate the ability of pyridoxal-5'-phosphate at concentrations of $1*10^{-8}$-$1*10^{-4}$ mol/l to induce statistically significant changes in the values of the ISP amplitude and such ISP parameters: the latent period, the amplitude, rate of rise of up to the half of amplitude and decay time to the half of amplitude. These changes were generally similar to those described for the SM of the small intestine of human.

Thus, the results of these experiments indicate the ability of endogenous derivative of vitamin B_6 pyridoxal-5'-phosphate to demonstrate the properties of the P_2- purinoreceptors blocker the human gut smooth muscles.

ВЛИЯНИЕ ДОНОРОВ *NO* НА УАБАИНЧУВСТВИТЕЛЬНУЮ Na^+, K^+-АТФАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ МИОМЕТРИЯ

Данилович Ю.В., Данилович А.В., Коломиец О.В.

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua

Показано эффективное ингибиторное влияние нитропруссида (10^{-9}-10^{-3} М) и нитрита натрия (10^{-7}-10^{-3} М) на Na^+, K^+-АТРазную активность во фракции сарколеммы миометрия (рис.1, а). Кажущаяся константа ингибирования K_i составляет 1,43+/-0,8 мкМ и 0,62+/-0,09 мкМ для нитропруссида и нитрита натрия соответственно. В серии исследований с нитропруссидом натрия (10^{-9}, 10^{-5} М) показано, что для АТР наблюдается бесконкурентный (значение K_m снижается с 270 мкМ до 160 мкМ, а также уменьшается максимальная скорость с 6,7 до 4,1 мкмоль P_i/мг белка в час), а для катионов - смешанный тип ингибирования (константа активации для K^+ увеличивается с 12 мМ до 25 мМ, но снижается максимальная скорость с 9,9 до 5,7 мкмоль P_i/мг белка в час). Эффективность ингибиторного действия уабаина на Na^+,K^+-АТРазную активность снижается в присутствии нитропруссида и нитрита натрия (10^{-9}, 10^{-6} М), а дитиотрейтол защищает энзим от влияния нитропруссида натрия. Кинетический анализ этих экспериментов позволяет предположить, что в основе ингибирующего действия нитропруссида и нитрита натрия может лежать химическая модификация тиольных групп аминокислотных остатков, которые важны для проявления каталитической активности.

В сравнительных исследованиях на постъядерной фракции показан стимулирующий эффект на Na^+, K^+-АТРазную активность как нитропруссида и нитрита натрия, так и cGMP (рис.1, б). Ингибитор растворимой гуанилатциклазы метиленовый синий предотвращал активирующее действие только нитрита натрия. Если предположить, что в постядерной фракции присутствуют в нативном состоянии все компоненты сигнального пути “NO – растворимая гуанилатциклаза – cGMP – PK G”, то существует возможность активирующего фосфорилирования Na^+, K^+-АТРазы. Таким образом, анализ результатов предполагает cGMP-зависимый путь активации фермента в случае нитрита натрия и cGMP-независимое ингибирование при использовании как нитропруссида, так и нитрита натрия. Можно предположить, что в условиях умеренного образования оксида азота и отсутствия гиперпродукции активных форм кислорода доминирует именно тот путь, который ведет к активации энзима.

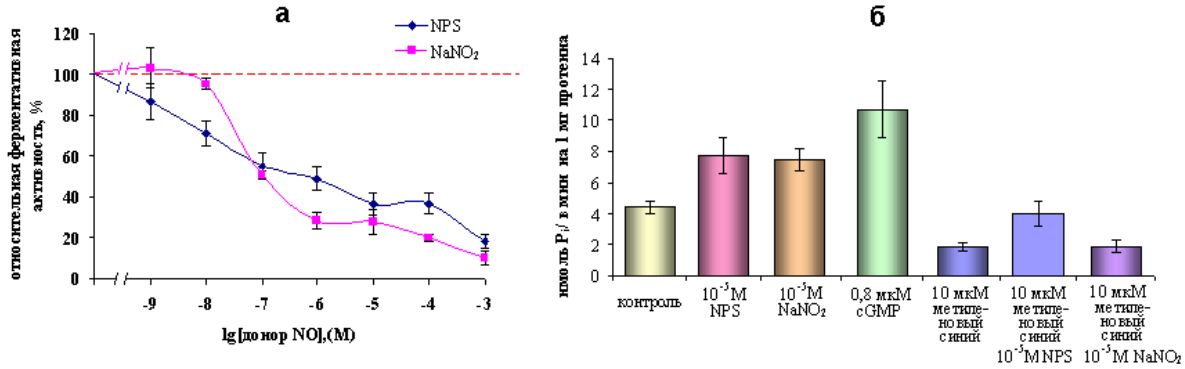


Рис.1. Эффекты нитропруссида натрия (NPS) и нитрита натрия на Na^+, K^+-АТРазную активность во фракции сарколеммы (а) и постядерной фракции (б) мышечной ткани матки (M±m, n=5).

EFFECTS OF *NO*-DONORS ON OUABAINE-SENSITIVE *Na*+, *K*+-ATPASE ACTIVITY OF MYOMETRIUM SMOOTH MUSCLE

Danylovych Yu V., Danylovych G.V., Kolomiets O.V.

Palladine Institute of Biochemistry, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: danylovych@biochem.kiev.ua

Effective inhibiting effect of sodium nitroprusside (10^{-9}-10^{-3} M) and nitrite (10^{-7}-10^{-3} M) on Na^+, K^+-ATPase enzymatic activity of miometrium sarcolemma fraction was shown (Fig.1, a). Seeming Ki was 1,43+/-0,8 microM и 0,62+/-0,09 microM for sodium nitroprusside and nitrite respectively. Investigations with sodium nitroprusside (10^{-9}, 10^{-5} M demonstrated an uncompetitive inhibition for ATP (decrease K_m from 270 microM to 160 microM and reduction of maximal velocity from 6,7 to 4,1 μmol P_i / mg protein per 1 hour) and mixed inhibition for cations (increase constant of activation for K^+ from 12 mM to 25 mM, but decrease of maximal velocity from 9,9 to 5,7 μmol P_i / mg protein per 1 hour). Inhibitory effect of ouabain was reduced in the presence of sodium nitroprusside and nitrite (10^{-9}, 10^{-6} M); ditiothreitol prevented enzyme inactivation by sodium nitroprusside. Kinetic analysis of experimental results using ouabain and ditiothreitol suggests chemical modification of enzyme sulfhydryl groups.

In comparative investigations with postnucleus fraction stimulating actions of sodium nitroprusside, sodium nitrite, cGMP on Na^+, K^+-ATPase enzymatic activity were shown (Fig.1, b). Methylene blue (soluble guanilatecyclase inhibitor) prevented the activation of Na^+, K^+-ATPase activity by sodium nitrite. If assume that postnucleus fraction contain all components of transduction pathway “NO – soluble guanilatecyclase – cGMP – PK G”, we can suppose possibility of activating phosphorylation of Na^+, K^+-ATPase. So, analysis of results suggests cGMP-dependent way of activation of enzyme by sodium nitrite and cGMP-independent inhibition by sodium nitroprusside and nitrite. We suppose that the way of enzyme activation is prevalent in the condition of the moderate formation of nitric oxide and in the absence of hyper(over)production of reactive oxygen species.

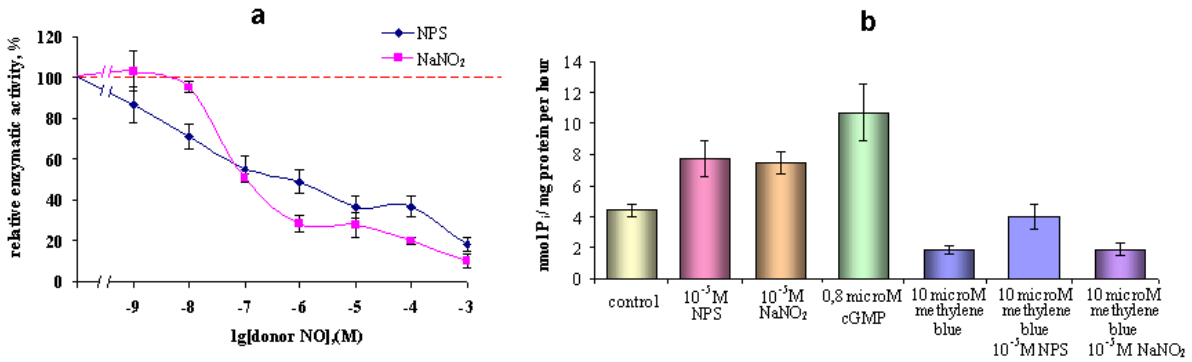


Fig. 1 Effects of sodium nitroprusside (NPS) and nitrite on Na^+, K^+-ATPase enzymatic activity of sarcolemma fraction (a) и postnucleus fraction (b) of myometrium smooth muscle (M±m, n=5).

ВЛИЯНИЕ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА АДАПТАЦИЮ МЕТАБОЛИЗМА ARABIDOPSIS THALIANA К ДЕЙСТВИЮ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВ

[1]Деревянчук М.В., [1]Кретинин С.В., [2]Литвиновская Р.П., [2]Хрипач В.А., [1]Кравец В.С.

[1]Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: derevyanchuk@bpci.kiev.ua; kravets@bpci.kiev.ua
[2]Институт биоорганической химии НАН Белоруси, Минск, Беларусь

Брассиностероиды (БС) – высокоактивные полигидроксильные стероидные фитогормоны, проявляющие широкий спектр физиологических и биохимических реакций - регуляция процессов роста и развития, обеспечение репродуктивной функции, адаптация к действию стрессового фактора. Изучение механизма индукции устойчивости клетки к действию негативного фактора среды при участии БС способствует расширению представления о реализации БС в клетке и практического использования в качестве регулятора роста и устойчивости.

По представлениям на данный момент считается, что рецептор сигнала БС состоит из двух киназ – BAK1 и BRI1, димеризация, которых инициирует запуск трансдукции сигнала в ядро. Трансгенные растения с мутациями в гене *BRI1* не способны воспринимать сигнал БС и акуммулируют значительные уровни эндогенных БС. С другой стороны трансгенные растения с мутациями в гене *BAK1* способны развивать фенотип растений дикого типа, но отличаются значительно ниже устойчивостью к действию стрессов. BRI1 киназа также способна димеризоваться с рецептором флагелина, что указывает на роль БС в устойчивости к биотическим стрессам также.

Для исследования влияния роли БС в адаптации метаболизма растений мы использовали ряд трансгенных растений Arabidopsis thaliana с мутациями в генах отвественных за образование и рецепцию сигнала БС. Нами было установлено, что при действии холодового стресса экзогенные брассиностероиды (24-эпибрассинолид, 28-гомобрассинолид, 24-эпикастастерон) способствовали более активному росту как растений дикого типа так и трансгенных *det2* растений по биосинтезу БС. Проведенные последующие эксперименты на проростках кукурузы обнаружили, что в ответ на действие продолжительного холодового стресса растения аккумулируют значительные уровни эндогенных брассиностероидов – 24-эпибрассинолида, брассинолида и 28-гомобрассинолида. Также было установлено, что предобработка растений кастастероном, предшественником указанных БС, увеличивает уровень эндогенных БС. Эти факты указывают на прямое участие БС в процессах адаптации БС к действию абиотического стресса.

Последующие исследования выявили роль БС в регуляции активности ряда антиоксидантных систем, увеличении эндогенного уровня активных форм кислорода и пролина в условиях действия осмотического стресса. Анализ устьичного аппарата замыкающих клеток с использованием трансгенных растений *bak1* установил, что природные и химически модифицированные брассиностероиды влияют на устойчивость клеток к действию теплового стресса.

Методами радиоактивного мечения и авторадиографии нами было установлено изменения профиля белков при действии БС, а также участие компонентов липидной сигнализации в реализации действия БС.

Работа выполнена при поддержке Фонда фундаментальных исследований Украины № 29.4/020-2009 и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований № Х09К-029.

ROLE OF BRASSINOSTEROIDS IN METABOLISM ADAPTATION OF ARABIDOPSIS THALIANA TO ABIOTIC STRESS ACTION

[1]Derevyanchuk M.V., [1]Kretinin S.V., [2]Litvinovska R.P., [2]Khripach V.A., [1]Kravets V.S.

[1]Institute of bioorganic chemistry and petroleum chemistry NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: derevyanchuk@bpci.kiev.ua; kravets@bpci.kiev.ua
[2]Institute of bioorganic chemistry NAS of Belarus, Minsk, Belorussia

Brassinosteroids (BR) is a high-bioactive group of polyhydroxyl steroid phytohormones appearing to act in the wide range of physiological and biochemical reactions including plant growth and development, reproductive function, adaptation to stress factor action. Among them induction of cell resistance to stress action with BR application is the growing trend to extend a view of BR implementation for practical use as a bioregulator.

For the living considerations it is believed that BR receptor consists of kinases pair – BAK1 and BRI1, and their dimerisation is essential for initiation of BR signal transduction into cell nucleus. Transgenic plants with a “knockout” in the *BRI1* are not capable to perceive BR while accumulating significant level of endogenous BR. On the other part, mutation in *BAK1* gene allows developing of wild-type like phenotype, but with greatly reduced capacity of stress resistance. BRI1 kinase is capable to make dimers with FLS, flagellin receptor, as well, that links BR signaling to biotic stress resistance.

Investigation of BR action in metabolism adaptation implicated a range of transgenic plants of Arabidopsis thaliana with the mutations in the sites which are responsible for BR perception or biosynthesis. This enabled us to observe a significant promotion of growth in the wild-type *col1* and BR-deficient *det2* plants under cold stress condition by exogenous applied BRs (24-epibrassinolide, 28-homobrassinolide, 24-epicastasterone). Our next experiments found out that in response to prolonged cold stress action maize seedlings accumulated substantial levels of typical endogenous brassinosteroids – 24-epibrassinolide, brassinolide and 28-homobrassinolide. The additional administration with brassinolide precursor castasterone induced level of endogenous BRs. These results testify on the direct involvement of BRs in the reactions to abiotic stress action.

Carried out next experiments indicate that BR possessed to regulate activity of the main antioxidant systems – catalase, peroxidase and superoxide dismutase. BR also induced level of endogenous reactive oxygen species and proline aminoacide under osmotic stress conditions which always facilitate for higher survival rate of stressed plants. Natural and synthetically modified BRs increased stress tolerance to high temperatures in the test with stomata cells functioning of *bak1* plants.

With the methods of *in vivo* tissue radiolabelling and autoradiography we analyzed changes in protein synthesis profiles in response to BR application and participation of components of lipid signaling in BR transduction as well.

The investigation was supported by the state fund for fundamental researches of Ukraine №29.4/020-2009 and Belarusian republican foundation for fundamental research № X09K-029.

РОЛЬ ЭКЗОГЕННЫХ БРАССИНОСТЕРОИДОВ В РЕАЛИЗАЦИИ ПРОГРАММЫ МОРФОГЕНЕЗА ПРОРОСТКОВ *ARABIDOPSIS THALIANA* НА СИНЕМ СВЕТУ

[1]Ефимова М.В., [1]Ковтун И.С., [2]Хрипач В.А., [3]Кузнецов В.В., [1]Карначук Р.А.

[1]Томский государственный университет, Томск, Россия
e-mail: kovtunirina@sibmail.com
[2]Институт биоорганической химии НАНБ, Минск, Беларусь
[3] Институт физиологии растений РАН им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

Наряду с экзогенными факторами, в качестве регуляторов роста и развития растений могут выступать различные эндогенные системы. Одной из важнейших является фитогормональная регуляция. Действуя дистально, в малых концентрациях, фитогормоны способны оказывать значительное влияние не только на онтогенез растений, но и на защитную и адаптационную системы.

Из известных сегодня классов фитогормонов наибольший интерес представляют стероидные гормоны растений, впервые выделенные из пыльцы рапса (*Brassica napus* L.), названные брассиностероидами (БС). Среди БС наибольшей физиологической активностью обладают брассинолид (БЛ), эпибрассинолид (ЭБЛ) и гомобрассинолид (ГБЛ). Для них характерна ярковыраженная ростостимулирующая активность и способность взаимодействовать с другими растительными гормонами, что позволяет вызывать широкий спектр физиологических реакций от стимуляции роста растений до их адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды. Особо следует отметить их способность «имитировать» действие света, сходным образом контролируя скорость и характер протекания морфофизиологических процессов в растениях. С другой стороны, известно, что экспрессия генов синтеза и деградации брассиностероидов контролируется спектральным составом света

Нами было исследовано действие экзогенных БС (БЛ, ЭБЛ и ГБЛ, 0,01мкМ) на морфогенез проростков *Arabidopsis thaliana* при ежедневном досвечивании синим светом. В качестве модельных объектов использовали экотип Columbia и его мутант с нарушенным синтезом БС - *det2*. Контролем служили этиолированные проростки.

Нарушение биосинтеза БС у мутанта *det2* приводило к ингибированию растяжения клеток осевых органов (зародышевого стебля и корня). Действие экзогенных БС выражалось в стимуляции роста гипокотиля и семядолей. У проростков дикого типа брассиностероиды активировали световую программу развития в темноте, что выражалось в усилении роста семядолей. Наибольший эффект отмечен для брассинолида. Ежедневное 30-минутное досвечивание синим светом вызывало рост семядолей как у родительской линии, так и у мутанта, укорочение гипокотиля наблюдалось только у проростков родительской линии. При совместном действии синего света и БС наблюдалось сложение эффектов для семядолей проростков дикого типа и *det2*. У мутанта синий свет подавлял удлинение гипокотиля, вызванное брассиностероидами.

Таким образом, показано взаимодействие брассиностероидов и синего света при реализации программы морфогенеза проростков *Arabidopsis thaliana*.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (П1369).

THE ROLE OF EXOGENOUS BRASSINOSTEROIDS IN MORPHOGENETIC PROGRAM REALIZATION OF *ARABIDOPSIS THALIANA* SEEDLINGS UNDER BLUE LIGHT

[1]Efimova M.V., [1]Kovtun I.S., [2]Khripach V.A., [3]Kusnetsov V.V., [1]Karnachuk R.A.

[1]Tomsk state university, Tomsk, Russia
e-mail: kovtunirina@sibmail.com
[2]Institute of bioorganic chemistry NASB, Minsk, Belarus
[3] Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia

Exogenous and also endogenous factors can perform regulation role in plant growth and development. One of them, as most important, is the phytohormonal system. Acting distally, in small concentrations, phytohormones are able to have significant influence, not only on ontogeny, but on protective and adaptive systems.

Among the known classes of phytohormones, the steroids plant hormones are most attractive for researches. These group of hormones, which were called brassinosteroids (BS), first were obtained from the rape pollen (*Brassica napus* L.). Of all brassinosteroids, brassinolide (BL), epibrassinolide (EBL) and homobrassinolide (HBL) have the most physiological activity. Pronounced stimulating growth activity and ability to interact with other plant hormones are typical for BS, which allows cause a wide range of physiological reaction: from stimulation of plant growth to their adaptation to changing environment conditions. It should be especially stressed their capacity to imitate the light effect, similarly controlling the speed and character of passing morphophysiological processes in the plants. On the other hand it is known that BS's synthesis and degradation gene expression are controlled by light spectral composition.

The effect of exogenous BS (BL, EBL and HBL, 0,01μM) on morphogenesis of *Arabidopsis thaliana* seedlings under blue light were studied. Ecotype Columbia and its mutant with disturbed synthesis of BS – *det2*, were used as a modal object. Etiolated seedlings were used as a control.

Disturbed of BS's synthesis in *det2* seedlings led to inhibition of cell elongation of axial organs (embryonic stem and root). The effect of exogenous BS was showed in hypocotyl and cotyledons area growth stimulation. Exogenous BS activated light development program in the wild type seedlings in darkness, which were expressed in promotion of cotyledons growth. The highest effect was noted for BL. Deetiolation of Arabidopsis seedlings for 30 minutes with blue light caused the cotyledons growth of wild type and mutant, decrease of hypocotyl length was observed only of N-type seedlings. Simultaneous influence of blue light and BS displayed addition of effects in growth of cotyledons areas of both types was observed. Increase of mutant hypocotyl growth in response to brassinosteroids was negotiated by blue light.

So, the interaction of brassinosteroids and blue light was showed in realization of morphogenetic program of *Arabidopsis thaliana* seedlings.

The research was supported by Federal Agency of Education (State Contract no. P1369) and Russian Foundation for Basic Research.

РАЗРАБОТКА НОВОЙ МОДЕЛИ ГЛИОМЫ С ПОМОЩЬЮ ХИТИНАЗА 3-ПОДОБНОГО 1 ОНКОГЕНА (*CHI3L1*)

Кавсан В.М., [2]Баклаушев В.П., [1] Балынская Е.В., [2]Усубалиева Г.М., [2]Гриненко Н.Ф., [2]Викторов И.В., [2]Чехонин В.П.

[1]Институт молекулярной биологии и генетики, Киев, Украина,
e-mail: kavsan@imbg.org.ua
[2] ГНЦ социальной и судебной психиатрии им. В.П.Сербского, Москва, Россия

Модели злокачественных новообразований человека у грызунов являются необходимым инструментом для понимания основных принципов биологии рака, поэтому создание модели опухоли головного мозга у крысы с помощью ортотопической имплантации ксеногенных трансформированных клеток человека представляется весьма актуальным. Ранее, пытаясь идентифицировать гены, которые можно использовать в качестве молекулярных маркеров глиальных опухолей головного мозга человека, среди генов с наиболее заметным увеличением экспрессии в опухолях, мы нашли ген *CHI3L1* [1], кодирующий секретируемый хитиназа 3-подобный белок 1 семейства гликозилгидролаз 18. Несмотря на отсутствие синтеза хитина (поли-N-глюкозамина) у млекопитающих, геномы членов этого семейства кодируют набор гомологичных хитиназаподобных белков, и CHI3L1 – наиболее изученный белок этой группы. Он имеет молекулярную массу около 40 кДа и N-гликозилирован в позиции Asn^{60}. Мономер CHI3L1 состоит из 383 а.к., содержит сигнальный пептид Met^{1}-Ala^{21} для секреции и два структурных домена. Экспрессия *CHI3L1* обнаружена в синовиальных клетках, хондроцитах суставного хряща, опухоль-ассоциированных макрофагах, клетках воспаления, он участвует в клеточной пролиферации, дифференциации, ангиогенезе и механизмах инвазивности, ремоделируя внеклеточный матрикс. В ряде работ по геноой экспрессии показано, что *CHI3L1* – один из наиболее суперэкспрессированных генов в различных опухолях, в основном, на последних стадиях опухолевой прогрессии. Уровень его экспрессии значительно повышен в ряде клеточных линий, полученных из таких опухолей, в том числе опухолей костного мозга, молочной железы, легких и яичников. Полагают, что *CHI3L1* регулирует туморогенез, прерывая сигнальный путь, ведущий к апоптозу [2].

Чтобы выяснить роль CHI3L1 в туморогенезе, *CHI3L1* эктопически экспрессировали в клетках 293. Суперэкспрессия CHI3L1 приводила к усилению клеточной пролиферации, независимому от подложки росту клеток на мягком агаре и формированию опухолей в головном мозге крыс. Патологический анализ показал слабую дифференцировку этих опухолей. Выявлено повышение экспрессии сигнальных путей MAPK и PI3K в клетках 293, экспрессирующих CHI3L1. Т.о., CHI3L1 - сильный онкоген, способный индуцировать трансформацию клеток человека, его суперэкспрессия - критична для развития опухоли.

Чтобы изучить влияние CHI3L1 *in vivo*, клетки 293, которые стабильно экспрессируют *CHI3L1*, стереотактически имплантировали в полосатое тело головного мозга самок крыс линии Wistar. На 21-й день после имплантации у всех крыс наблюдались огромные интрацеребральные опухоли. Гистологический анализ показал смещение срединных церебральных структур и гидроцефалию в контралатеральном полушарии. Опухоли содержали плотный поверхностный слой клеток и выпуклые дольки с вновь образованными сосудами по центру. Иммуноокрашивание с антителами к CHI3L1 выявило CHI3L1-позитивные клетки в опухолевой ткани и на границе опухоли (инвазивная зона). Все опухоли были окружены многочисленными GFAP-позитивными реактивными астроцитами, которые обычно обнаруживаются в опухолях, инициированных клетками линий глиом высокой степени злокачественности. У крыс, которым ввели клетки 293, трансфицированные «пустым» вектором в качестве негативного контроля, роста опухоли не наблюдалось.

Клетки 293 сами по себе уже иммортализованы с помощью ДНК аденовируса 5. В данном случае, одна лишь эктопическая экспрессия *CHI3L1* приводит к туморогенной конверсии иммортализованных клеток 293 *in vitro* и *in vivo*. Иммортализация клетки – важное условие для ее трансформации, которая, наряду с другими онкогенными изменениями, программирует переход клетки к неопластическому состоянию. Механизмы, отвечающие за злокачественную трансформацию уже иммортализованных клеток 293 под влиянием CHI3L1, являются предметом дальнейших исследований. Образование опухоли клетками 293, стабильно экспрессирующими *CHI3L1*, в головном мозгу крыс однозначно указывает, что ген *CHI3L1* участвует в туморогенезе и может быть использован в качестве мишени для антираковых препаратов. Эта модель будет весьма полезной при разработке систем направленного ингибирования выработки онкобелков в клетках глиальных опухолей с минимальным побочным эффектом для нормальных клеток, поскольку такое ингибирование является критическим этапом при терапии злокачественных новообразований.

Литература:

1. *Shostak KO., Labunskyy VN, Dmitrenko VV, Malysheva TA, Shamayev MI, Rozumenko VD, Zozulya YP, Zehetner G, Kavsan VM. HC gp-39* gene is upregulated in glioblastomas. *Cancer Lett* 2003;**198**:203-10
2. *Johansen J.S.* Studies on serum CHI3L1 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. *Dan Med Bull* 2006;**53**:172–209.

DEVELOPMENT OF A NOVEL GLIOMA MODEL USING CHITINASE 3-LIKE 1 (*CHI3L1*) ONCOGENE

[1]Kavsan V.M., [2] BaklaushevV.P., [1]Balynska O.V., [2]Yusubalieva G.M., [2]Grinenko N.Ph., [2]Victorov I.V.,[2]Chekhonin V.P.

[1]Institute of Molecular Biology and Genetics, Kyiv, Ukraine. e-mail: kavsan@imbg.org.ua
[2] V.P. Serbsky National Research Centre for Social and Forensic Psychiatry, Moscow, Russia

Rodent models of human cancers have been instructional in understanding the basic principles of cancer biology. It is planned therefore to reconstitute a model of brain tumors in rats by orthotopic implantation of xenogenic transformed human cells. Previously, in an effort to dentify genes which could be used as molecular markers for glial tumors, among the genes with the most pronounced increasing expression in tumors we revealed *CHI3L1* [1], encoding the secreted chitinase 3-like 1 protein, which belongs to a family 18 glycosyl hydrolases. Despite the lack of chitin **(**poly-N-glucosamine) synthesis in mammalia, genomes of this family members code a set of homologous chitinase-like proteins. In human there are six proteins of this family and CHI3L1 is the most investigated protein of the group. It has a molecular weight of about 40 kDa and N-glycosylation at Asn^{60}. CHI3L1 monomer consists of 383 amino acid residues, contains a signal peptide Met^{1}–Ala^{21} for secretion and two structural domains. CHI3L1 has been investigated extensively with respect to its expression patterns and possible association with inflammation and cancer. *CHI3L1* expression was found in synovial cells, articular cartilage chondrocytes, tumor-associated macrophages, inflammatory cells and is involved in cell proliferation, differentiation, protection from apoptosis, angiogenesis, and invasiveness *via* remodeling of the extracellular matrix. A number of gene expression studies revealed *CHI3L1* as one of the most overexpressed genes in different tumors, basically on the last stages of tumor progression. It is increased significantly also in cell lines derived from such tumors, including tumors of the bone, brain, breast, lung, and ovary. It is thought to regulate tumorigenesis by interrupting pathways which lead to apoptosis [2].

In order to more comprehensively elucidate the relationship between human CHI3L1 and tumorigenesis, the CHI3L1 was ectopically expressed in the 293 cell line to investigate its potential for malignant transformation of cells both *in vitro* and *in vivo*. Here we provide compelling evidence that the overexpression of CHI3L1 resulted in increased cell proliferation, anchor-independent growth in soft agar, and formation of tumors in the rat brains. Pathologic analysis revealed that these tumors were poorly differentiated. In analysis of the underlying molecular mechanism, two main cellular signaling pathways, MAPK and PI3K, were identified to be upregulated in the CHI3L1 expressing 293 cells. Our results demonstrate that CHI3L1 is a potent human oncogene and has the ability to induce cellular transformation of human cells.

In order to obtain a novel glioma model*,* 293 cells, which stably expressed *CHI3L1* or 293 cells transfected with empty vector were stereotactically implanted in the striatum of female Wistar rats. Huge intracerebral tumors were observed in each of rats under investigation on the 21st day after implantation. Histological assay revealed displacement of median cerebral structures and hydrocephalus in contralateral hemisphere. Tumors contained the dense superficial cell layer and prominent lobules with central newly ingrowing blood vessels. Immunostaining with anti-CHI3L1 antibodies revealed CHI3L1-positive cells both in tumor tissue and in the border of tumor (an invasion zone). All tumors were surrounded by numerous GFAP-positive reactive astrocytes what is usually observed in tumors, initiated by high grade glioma cultured cells. No tumor growth was observed for at least 6 weeks in rats injected with empty vector-transfected 293 cells as a negative control.

293 cells themselves are immortalized already with sheared adenovirus 5 DNA. Immortality is an essential requirement for transformation that cooperates with other oncogenic changes to program the neoplastic state. Here, ectopic expression of *CHI3L1* alone results in the direct tumorigenic conversion of immortalized 293 cells *in vitro* and *in vivo*. Which mechanisms are responsible for malignant transformation of already immortalized 293 cells under the influence of CHI3L1 is an aim of further investigations. Tumor formation by 293 cells stably expressing *CHI3L1* in rat brains strongly suggests that this gene is likely to be critical in the development tumors and *CHI3L1* can be used as a target for anticancer drug development. This model is going to be very useful for developing systems of oncoprotein synthesis targeted inhibition in glial tumor cells, a critical step for malignant tumors treatment with minimal side effects on the normal cells.

References:

1. *Shostak KO, Labunskyy VN, Dmitrenko VV, Malysheva TA, Shamayev MI, Rozumenko VD, Zozulya YP, Zehetner G, Kavsan VM. HC gp-39* gene is upregulated in glioblastomas. *Cancer Lett* 2003;**198**:203-10
2. *Johansen JS.* Studies on serum CHI3L1 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer. *Dan Med Bull* 2006;**53**:172–209.

САЛИЦИЛОВАЯ КИСЛОТА КАК ИНДУКТОР ЛИПИДНОГО СИГНАЛИНГА И ГЕНЕРАЦИИ СУПЕРОКСИД-РАДИКАЛОВ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ

Калачёва Т.А., Яковенко О.Н., Кретинин С.В., Кравец В.С.

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: kalachova@bpci.kiev.ua

Салициловая кислота – фитогормон, ассоциированный с первичными защитными реакциями метаболизма на биотический стресс и формированием системной приобретенной устойчивости. Среди известных эффектов салициловой кислоты (СК) важнейшим является всплеск активных форм кислорода, генерируемый мембранными НАДФН-оксидазами. В то же время, вопрос о непосредственных мишенях СК и индуцируемых ею в клетке сигнальных каскадах требует дальнейшего изучения. Существуют отдельные факты, свидетельствующие о возможном участии в реакциях клеток растений на экзогенную СК ферментов липидного метаболизма, в частности фосфолипаз С и D, и последующее накопление фосфатидной кислоты (ФК) - вторичного посредника липидного сигналинга, ассоциированного с адаптивными реакциями, который также выступает прямым активатором мембранных НАДФН-оксидаз.

С применением радиоизотопного [^{33}P] мечения и последующей тонкослойной хроматографии меченых фосфолипидов на модельных растениях *Arabidopsis thaliana* было показано накопление ФК уже через 15 мин воздействия 1мМ СК, что свидетельствует об активации ферментов липидной сигнализации, в частности фосфолипазы D и диацилглицеролкиназ. Активация именно фосфолипазы D у растений дикого типа Col-1 и дефектных по D–изоформе НАДФН-оксидазы AtRbohD была показана путем введения в среду инкубации тканей 0,8% 1-бутанола, что приводило к образованию фосфатидилбутанола в результате активации ФЛD. Всплеск активности НАДФН-оксидаз в ответ на инфильтрацию СК показывали гистохимически с использованием нитросинего тетразолия, образующего окрашенный комплекс с супероксидными радикалами.

Далее нами на модельной системе устьичного аппарата растений арабидопсиса было исследовано *in vivo* участие ФЛD и НАДФН-оксидаз в трансдукции сигнала салициловой кислоты (СК). Было показано ингибирование СК-индуцированного закрытия устьиц 1-бутанолом, в то время как 2-бутанол не вызывал аналогичной реакции. Предварительная обработка специфичным ингибитором НАДФН-оксидаз (diphenyleneiodonium) предотвращала закрывание устьиц СК. При обработке DPI растений AtRbohD действие СК не вызывало достоверных изменений апертуры устьиц, что свидетельствует об ингибировании других изоформ НАДФН-оксидаз. Таким образом, D изоформа является ключевой изоформой НАДФН-оксидаз, задействованных в процессе закрывания устьиц в ответ на биотический стресс. У трансгенных растений с подавленной экспрессией генов НАДФН-оксидазы RbohD наблюдалось ослабление реакций устьичной апертуры в ответ на экзогенное внесение СК, в то время как реакция H_2O_2 не отличалась от такой у растений дикого типа, что свидетельствует о каскадном расположении ФЛD и НАДФН-оксидазы как компонентов сигнального пути СК.

Исследования выполнены при поддержке Грантов НАН Украины 2.1.10.32-09; №8-10 и Фонда фундаментальных исследований Украины №Ф29.4/019.

SALICYLIC ACID AS AN INDUCTOR OF LIPID SIGNALING AND SUPEROXIDE RADICAL GENERATION IN PLANT CELLS

Kalachova T.A., Iakovenko O.M., Kretinin S.V., Kravets V.S.

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: kalachova@bpci.kiev.ua

Salicylic acid is a phytohormone associated with the primary defense responses to biotic stress and formation of systemic acquired resistance. Among known effects of salicylic acid (SA) one of the most significant is facilitation of reactive oxygen species generation by membrane NADPH oxidases. At the same time, little is known about immediate targets of SA and its induced signaling cascades. There are some evidences of possible involvement of lipid metabolism enzymes, phospholipases C and D in particular, to plant cell reaction to exogenous SA application and the following accumulation of phosphatidic acid (PA) – lipid-derived second messenger, which also acts as a direct activator of membrane NADPH oxidases.

By using radioisotope [^{33}P] tissue labeling with subsequent thin-layer phospholipid chromatography and autoradiography on the model plant *Arabidopsis thaliana* accumulation of PA within 15 min of 1 mM SA treatment was shown. The findings suggest lipid signaling enzymes activation, especially phospholipase D and diacylglycerolkinases. Particular phospholipase D enzyme activation in wild-type Col-1 and D-isoform of NADPH-oxidase deficient AtRbohD was demonstrated by adding 0,8% 1-butanol to the incubation medium, which led to phosphatidylbutanol accumulation as a result of phospholipase D action. Rapid SA-induced increase in NADPH-oxidase activity was shown by histochemical assay with nitroblue tetrazolium, resulting in colored complex formation with superoxide radicals.

Involving of phospholipase D and NADPH oxidase to SA transduction pathways was additionally studied *in vivo* on *A. thaliana* guard cells model. SA-induced stomatal closure was inhibited by 1-butanol, but not by 2-butanol treatment. Pre-treatment by NADPH-oxidase specific inhibitor (diphenyleneiodonium) also prevented stomatal closure. DPI-pretreated AtRbohD plants did not show significant changes in stomatal aperture under SA influence, indicating the inhibition of remaining NADPH-oxidase isoforms. Thus a key role of D-isoform of NADPH-oxidase in the process of stomatal closure in response to biotic stress has been postulated. AtRbohD transgenic plants showed impaired stomatal reaction upon SA application, while the reaction to H_2O_2 did not differ from that of wild-type plants. Thereby conducted research work has enabled to predict a cascade implication of phospholipase D and NADPH oxidase to SA signaling pathway in Arabidopsis.

Research was supported by grants NAS 2.1.10.32-09; № 8-10, and the State Fund for Fundamental Research of Ukraine № F29.4/019.

РОЛЬ КАЛЬЦИЯ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФОСФОЛИПАЗЫ D ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИТОКИНИНОВ

[1]Колесников Я.С., [1]Кретинин С.В., [2]Романов Г.А., [1]Кравец В.С.

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: kravets@bpci.kiev.ua
[2]Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

Цитокинины играют ключевую роль в регуляции многих аспектов роста и развития растений. Молекулярный механизм действия цитокининов в клетках изучается интенсивно и требует дальнейших исследований. Фосфолипаза D (ФЛD) является важным компонентом трансдукции сигналов в клетках растений. Ранее нами была показана быстрая активация ФЛD в ответ на действие цитокининов в проростках амаранта (*Amaranthus caudatus* L.) [Kravets et al., 2010].

Важная роль в регуляции активности ФЛD клеток растений принадлежит ионам кальция. Кальций связывается с доменом C2 фермента, стимулируя его присоединение к мембранами, обогащенными на субстраты, а также ассоциируется с активным центром ФЛD, повышая ее сродство к кофактору – фосфатидилинозитолбисфосфату. Это приводит к активации ФЛD [Pappan et al., 2004]. В клетках растений существуют различные молекулярне формы ФЛD, активные в условиях определенных концентраций ионов кальция. Оптимум активности ФЛDα обнаружен при миллимолярных, ФЛDβ и ФЛDγ – при микромолярных, тогда как ФЛDδ и ФЛDε – в диапазоне от микромолярных до миллимолярных концентраций ионов кальция. Активность ФЛDζ не зависит от указанных ионов, поскольку этот фермент не содержит в своей структуре домена C2 [Li et al., 2009].

Целью представленной работы было определить участие Ca^{2+}-зависимой фосфолипазы D в реализации действия цитокининов. Для проведения анализа фосфолипидов в ткани растений амаранта вводили [^{33}P]-ортофосфат (Amersham) втечение 14 часов при 25˚C. Растения отмывали от избытка фосфора и обрабатывали 5 мкМ цитокинина БА. Для анализа активности фосфолипазы D *in vivo* использовали реакцию трансфосфатидилирования. С этой целью в ткани растений вводили 0,8% 1-бутанол. Для определения роли ионов кальция в регуляции активности ФЛD цитокининами использовали ЭГТА (5 мМ), хелатор кальция в апопласте, и верапамил (0,3 мМ), блокатор каналов кальция плазматической мембраны. Растения фиксировали в жидком азоте и использовали для экстракции и разделения липидов. В результате проведенных исследований было зарегистрировано резкое повышение интенсивности формирования продукта реакции ФЛD – фосфатидилбутанола под влиянием БА, что указывало на активацию ФЛD. Введение в клетки ЭГТА и верапамила угнетало указанный процесс. Более сильное угнетение активации ФЛD цитокининами было отмечено в опытах с использованием верапамила. Это, возможно, связано с тем, что указанный ингибитор предотвращает проникновение в цитозоль клетки ионов кальция. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии ионов кальция в регуляции активности ФЛD при действии цитокининов.

Работа поддержана грантами НАН Украины (5/3-08; 5/1-09 и 2.1.10.32-10)

Литература:

1. *V.S. Kravets, Ya.S. Kolesnikov, S.V. Kretynin, I.A. Getman, G.A. Romanov* // Rapid activation of specific phospholipase(s) D by cytokinin in *Amaranthus* assay system - Physiologia Plantarum, 2010, v. 22, N138, p. 249–255
2. *K. Pappan, L. Zheng, R. Krishnamoorthi, X. Wang* // Evidence for and characterization of Ca^{2+} binding to the catalytic region of *Arabidopsis thaliana* pospholipase Dβ - J. Biol. Chem., 2004, v. 279, N46, p. 47833—47839
3. *M. Li, Y. Hong, X. Wang* // Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants - Biochim. Biophys. Acta., 2009, vol. 1791, N9, p. 927—935

THE ROLE OF CALCIUM IN PHOSPHOLIPASE D ACTIVITY REGULATION BY CYTOKININS

[1]Kolesnikov Ya.S., [1]Kretynin S.V., [2]Romanov G.A., [1]Kravets V.S.

[1]Institute of bioorganic chemistry and petrochemistry NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: kravets@bpci.kiev.ua
[2]Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Cytokinins play an important role in regulation of different aspects of plant growth and development. Molecular mechanisms of cytokinin signaling in plant cells are under extensive studies and need further investigation. Phospholipase D (PLD) is considered as a major component of many signal transduction pathways in plant cells. Earlier we have shown rapid activation of PLD in response to cytokinins in amaranthus (*Amaranthus caudatus* L.) [Kravets et al., 2010].

Calcium is an important regulator of PLD activity in plant cells. It binds to C2 domain of PLD, promoting recruitment of the enzyme to membranes rich in substrates, and associates also with PLD active site, increasing enzyme affinity to cofactor – phosphatidylinositolbisphosphate. This consequently leads to PLD activation [Pappan et al., 2004]. Different PLD isoenzymes have been found in plant cells, with individual sensitivity to calcium concentrations. PLDα is most active in millimolar, PLDβ and PLDγ – in micromolar, whereas PLDδ and PLDε – from micromolar to millimolar calcium concentrations. PLDζ does not contain C2 domain and is a calcium-independent isoenzyme [Li et al., 2009].

The aim of our investigation was to assess the participation of Ca^{2+}-dependent phospholipase D in cytokinin action. For phospholipids analysis, amaranthus tissues were incubated in [^{33}P]-orthophosphate (Amersham) during 14 h in 25˚C. Plant were washed from excess of unbound phosphorus and treated with 5 μM cytokinin BA during 30 min. Transphosphatidylation ability of phospholipase D was recorded to analyze its activity in vivo. For this reason, 0.8% 1-butanol was administrated to plant tissues. EGTA (5 mM), extracellular calcium chelator, and verapamyl (0.3 mM), inhibitor of plasma membrane calcium channels, were utilized for examination of calcium role in regulation of phospholipase D activity by cytokinins. Plants were fixed in liquid nitrogen and lipids were extracted and separated. Sharp increase in formation of PLD product phosphatidylbutanol was observed in BA-treated plants indicating PLD activation. Exogenous application of EGTA and verapamyl blocked the response. More dramatic decrease in cytokinin-induced PLD activity found in verapamyl assays. It is suggested that this decrease results from the retardation of calcium uptake into cytosol. These findings demonstrate that calcium regulates PLD activity during cytokinin action.

This work was supported by the NAS of Ukraine (project nos. 5/3-08; 5/1-09 and 2.1.10.32-10)

References:

1. *V.S. Kravets, Ya.S. Kolesnikov, S.V. Kretynin, I.A. Getman, G.A. Romanov* // Rapid activation of specific phospholipase(s) D by cytokinin in *Amaranthus* assay system - Physiologia Plantarum, 2010, v. 22, N138, p. 249–255
2. *K. Pappan, L. Zheng, R. Krishnamoorthi, X. Wang* // Evidence for and characterization of Ca^{2+} binding to the catalytic region of *Arabidopsis thaliana* pospholipase Dβ - J. Biol. Chem., 2004, v. 279, N46, p. 47833—47839
3. *M. Li, Y. Hong, X. Wang* // Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants - Biochim. Biophys. Acta., 2009, vol. 1791, N9, p. 927—935

ДІЇ ГОРМОНІВ ЕКДИСТЕРОНУ І МЕЛАТОНІНУ НА СИНТЕЗ РЕГУЛЯТОРІВ ПОРИ МРТР В МІТОХОНДРІЯХ СЕРЦЯ ЩУРІВ ЗА НОРМИ ТА ПАТОЛОГІЇ

Коркач Ю.П., Коцюруба А.В., Сагач В.Ф.

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, Украина
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, Украина
e-mail: yulyahim@ua.fm

Відомо, що активні метаболіти кисню (АФК) та азоту (АФА) є, серед інших, потужними ендогенними регуляторами проникливості мітохондріальної пори перемінної провідності (МРТР). Шляхи генерації АФК є більш дослідженими, ніж шляхи генерації АФА. Встановлено молекулярні, біохімічні та фізіологічні механізми регуляції синтезу NO активними формами кисню (супероксиданіон, пероксид водню), регуляції експресії генів і активності ферментів різних ізоформ NOS та ферментів біосинтезу їх кофакторів (тетрагідробіоптерин, НАДФН, ФАД), необхідних для роботи цих ферментів. В той же час на сьогодні не проведено жодного комплексного дослідження по одночасному вивченню активностей всіх відомих шляхів синтезу NO за різних фізіологічних умов.

Метою даної роботи стало вивчення особливостей синтезу АФК та АФА в мітохондріях серця щурів різного віку за нормальних фізіологічних умов, а також за різних патологічних станів – за діабету І типу та хвороби Паркінсона.

Дослідження проведені на ізольованих мітохондріях серця щурів-самців лінії Вістар різного віку (6 та 24 міс), за розвитку хвороби Паркінсона та діабету І типу. Кожну серію досліджень забезпечувалася своїм контролем. Старим щурам впродовж 14 діб вводили гормони мелатонін (внутрішньоочеревинно) у дозі 150мкг на 100 гр. маси тіла та C_{27}-стероїдний гормон екдистерон (структурний аналог вітаміну D3-кальцітриолу) (per os) у дозі 10мкг на 100 гр. маси тіла. Також екдистерон давали щурам per os, у дозі 10 мкг/100 гр впродовж: 6 тижнів –дорослим, впродовж 30 діб – за хвороби Паркінсона, та протягом 60 діб з першого дня після введення стрептозотоцину.

Вивчали інтенсивність генерації вільних радикалів кисню (O_2^{*-}, $^{*}OH$-радикал) і біохімічні показники, що характеризують інтенсивність окисного метаболізму L-аргініну (de novo синтез оксиду азоту) – активність різних ізоформ NO-синтаз і нітратредуктази (реутилізаційний синтез оксиду азоту), мітохондріальні пули стабільних метаболітів NO – нітрит- і нітрат-аніонів (NO_2^- і NO_3^-), низько- і високомолекулярних нітрозотіолів, а також активність неокисного аргіназного метаболізму L-аргініну шляхом визначення активності мітохондріальної аргінази і мітохондріальних пулів сечовини. З метою виявлення джерела супероксиду оцінювали мітохондріальні пули сечової кислоти, як маркера активності ксантиноксидази в мітохондріях, що генерує супероксид одночасно із окисненням гіпоксантину і ксантину.

Отримані дані вказують на те, що активні форми кисню і азоту (зокрема пероксинітрит) – активують МРТР, тоді як NO синтезований cNOS, але не iNOS чи шляхом реутилізації, навпаки, інгібує МРТР. Досліджені гормони екдистерон та мелатонін чинять свою кардіопротекторну дію в тому числі шляхом регуляції синтезу АФК та АФА в мітохондріях за рахунок проявів антиоксидантної дії та дії на різні шляхи біосинтезу NO стимулюючи конститутивний de novo синтез NO і, навпаки, інгібують його індуцибельний de novo синтез в ізольованиїх мітохондріях серця старих щурів і тварин з модельованими хворобами Паркінсона та діабету.

EFFECTS OF ECDYSTERONE AND MELATONIN HORMONES ON THE SYNTHESIS OF MPTP REGULATORS IN NORMAL AND PATHOLOGICAL CONDITION IN RAT HEART

Korkach Yu. P., Kotsuruba A.V., Sagach V.F.

Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: yulyahim@ua.fm

It is known that reactive oxygen and nitrogen species (ROS) and (RNS) are the powerful endogenous regulators of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP). The ways of ROS generation are well established, while sources of RNS are less studied.

NO synthesis depend from gene expression regulation of NOS enzymes, biosynthesis of cofactors (tetrahydrobiopterine, NADPH, FAD) required for these enzymes. Besides, NO synthesis is regulated with ROS (namely superoxide anion radical, hydrogen peroxide). At the same time there is no comprehensive study of activities of all known routes of synthesis of NO in different physiological and pathological conditions.

The aim of this work was to study the synthesis of ROS and RNS in mitochondria of rat hearts of different ages under normal and in different pathological conditions - diabetes and Parkinson's disease.

The study was performed on isolated heart mitochondria of Wistar male rats (6 and 24 months), after modeling the Parkinson's disease and streptozotocine-induced diabetes. Old rats were injected (intraperitoneal) with melatonin in a dose 150 mg 100 g of body mass and C27-steroid hormone ecdysterone (structural analogue of vitamin D3-calcitriol) (per os) in a dose 10 mg 100 g of body weight for 14 days. Also ecdysterone was given to rats per os, at a dose of 10 mg/100 for: 6 weeks – to adult and old rats, within 30 days - for Parkinson's disease and within 60 days from the first day after administration of streptozotocin.

We studied the intensity of the generation of ROS (O2*-, *OH) and biochemical markers of L-arginine oxidative metabolism (de novo synthesis of nitric oxide) - activity of different isoforms of NO-synthase and nitratreductase (salvage synthesis of nitric oxide), mitochondrial pools of stable metabolites of NO - nitrite and nitrate anion (NO2-and NO3-), low- and high-weigh nitrosothiols, and activity of non-oxidative metabolism of L-arginine by determining the mitochondrial activity and mitochondrial pools of arginase and urea. To identify sources of superoxide we estimated mitochondrial pools of uric acid as a marker of xantinoxidase activity in the mitochondria, which generates superoxide simultaneously with the oxidation and hypoxanthine and xantine.

Our findings indicate that extensive generation of ROS and RNS in old rats, diabetes and Parkinson's disease stimulate MPTP in rat heart mitochondria. Applied hormones ecdysterone and melatonin exert their cardioprotective effect by reducing the generation of ROS and RNS (namely peroxinitrite) in mitochondria through their antioxidant action. Furthermore, ecdysterone and melatonin enhanced NO synthesized by cNOS, but not iNOS, that inhibit MPTP. Thus, our results implicate that ecdysterone and melatonin stimulate NO biosynthesis by constitutively expressed NOS but inhibit NO synthesis by inducible NOS in heart mitochondria of old rats, diabetes and Parkinson's disease.

РОЛЬ ФОСФОЛІПАЗИ *D* В МЕРЕЖІ ФІТОГОРМОНАЛЬНОЇ СИГНАЛІЗАЦІЇ

Кравець В.С.

Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ, Україна
e-mail: kravets@bpci.kiev.ua;

Фітогормони відіграють важливу роль в регуляції метаболізму клітин, але молекулярні механізмі їх дії ще далекі від пізнання. Клітини рослин здатні як безпосередньо розпізнавати чинник, так і формувати відповідь на зміну внутрішніх та зовнішніх умов. Добре відомо, що фосфоліпіди є ключовими регуляторами метаболізму клітин. Більшість зовнішньоклітинних сигналів сприймаються рецепторами плазматичної мембрани та реакції на них формуються за участю похідних фосфоліпідів, які є продуктами ряду фосфоліпаз. Фосфоліпаза D (ФЛD) (EC 3.1.4.4) є ключовим ферментом, що каталізує гідроліз фосфоліпідів мембран, генеруючи фосфатидну кислоту (ФК) у відповідь на дію гормонів та зовнішні подразники. ФЛD розглядається як головний компонент багатьох сигнальних шляхів клітин рослин. ФЛD рослин є гетерогенною родиною ферментів, з найбільш різноманітними, біохімічними властивостями та структурами генів, порівняно з іншими організмами. Геном арабідопсис містить 12 генів ФЛD. Роль ФЛD у формуванні реакції на дію гормонів та стресів показана з використанням різних систем та підходів, як на генетичному рівні, нокаут, або ж над експресії генів так і з використанням фармакологічних підходів. В основу досліджень участі ФЛD у реакціях на дію цитокінів (БА) були покладенні спостереження за здатністю інгібувати біологічну дію БА низькими концентраціями первинних спиртів [1], потенційних інгібіторів формування ФК в процесі функціонування ФЛD. ФЛD та ФК залучені в реалізацію дії ряду гормонів, зокрема абсцизової кислоти[2] та цитокінів[2-3]. Нами було досліджено *in vivo* дію фітогормонів, сольового та осмотичного стресу на активність ФЛD тканин рослин. Фосфоліпіди клітин були мічені *in vivo* шляхом інкубації сім'ядолей амаранту та паростків кукурудзи в темноті з [^{33}Ф]ортофосфатом (100 мкКи/мл) при 25°С. Після інкубації, тканини рослин відмивали від [Ф^{33}] ортофосфату, що не включився в метаболізм. З метою визначення залежність часу активації ФЛD, в тканини рослин попередньо вводили розчин 0.8% н-бутанолу в буфері та додавали фітогормони, або ж розчин солі. Виявили різке збільшення синтезу фосфатидилбутанолу в перші 5 хвилин дії БА. Результати вказують на швидку активацію ФЛD сім'ядолей амаранту *in vivo* при введені до розчину БА. Таке швидке збільшення активності ФЛD за дії на тканини рослин *in vivo* цитокінінів вперше було показане нами і є вагомим аргументом на користь участі ФЛD в молекулярних механізмах реалізації дії цитокінінів. Наші результати переконливо вказують на активацію ФЛD тканин рослин за дії БА. Вказана фосфоліпаза тісно взаємодіє в мережі сигналів та залучає інші ферменти ліпідної сигналізації, перш за все фосфатидилінозитолкінази та фосфатази. Ми встановили, що за дії фітогормонів, сольового та осмотичного стресу активуються різні ізоформи ФЛD. Зміни активності відмінних ізоформ ФЛD обумовлює відмінність складу та властивостей їх ФК, та реакції метаболізму клітин, різні ФЛD та їх ФК проявляють відмінні функції. ФЛD є ключовим механізмом ліпідної сигналізації, що поєднує сприйняття сигналу мембранами клітин та його дію в клітині, формуючи відповідну реакцію метаболізму.

Робота виконана за підтримки грантів Державного фонду фундаментальних досліджень України (№ 29.4/020-2009) та НАН України (No5/1-09; 2.1.10.32-10).

Література:

1. *Romanov GA, Kieber JJ, Schmülling T* (2002) A rapid cytokinin response assay in Arabidopsis indicates a role for phospholipase D in cytokinin signaling. FEBS Lett 515: 39–43
2. *W. Zhang, C. Qin, J. Zhao, X.Wang,* Phospholipase Dα1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (2004) 9508–9513.
3. *V. S. Kravets, S. V. Kretinin, Ya. S. Kolesnikov, I. A. Getman, and G. A. Romanov.* Cytokinins Evoke Rapid Activation of Phospholipase D in Sensitive Plant Tissues. Doklady Biochemistry and Biophysics, 2009, Vol. 428, pp. 264–267.
4. *V.S. Kravets, Ya.S. Kolesnikov, S.V. Kretynin, I.A. Getman, G.A. Romanov* // Rapid activation of specific phospholipase(s) D by cytokinin in *Amaranthus* assay system - Physiologia Plantarum, 2010, v. 22, N138, p. 249–255.

ROLE OF PHOSPHOLIPASES D IN THE PHYTOHORMONES SIGNAL NETWORKS

Kravets V.S.

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: kravets@bpci.kiev.ua;

Phytohormones are known to play important roles in the metabolism regulation, but the molecular mechanism of their action are far from being understood. Plant cells are capable to directly sense and respond to changes in extracellular condition. It is also established, that phospholipids belong to key regulators of a plant cells metabolism. Many extracellular signals are perceived by plasma membrane receptors and converted into intracellular responses via phospholipid derivatives produced by different phospholipases. Phospholipase D (PLD) (EC 3.1.4.4) is the key enzyme that catalyses the hydrolysis of the membrane phospholipids, facilitating phosphatidic acid (PA) generation in response to hormones and environmental stimuli. PLD is considered as a major component of many signal transduction pathways in plant cells. Being a heterogeneous family, biochemical properties, domain structures and genomic organization of PLDs are more diverse in higher plants than in other organisms. The Arabidopsis genome contains 12 PLD genes. A role of PLD in the hormones and stress responses has been indicated in different systems using various approaches, such as gene knockout, over expression and pharmacological approaches. Initial evidence for PLD participation in the cytokinin benzylaminopurin (BA) response was based on a dose–dependent inhibition of BA action by low concentrations of primary alcohols [1], potent inhibitors of PA formation by PLD. PLDs and PA have been implicated in the action of several plant hormones, including ABA [2] and cytokinin [2-3]. The effect of phytohormones, salt and osmotic stress on the *in vivo* activity and PLD of the plant tissues were studied. Cellular phospholipids were labeled *in vivo* by incubating amaranth cotyledons and maize seedlings in the dark with [^{33}P] orthophosphate (100 µCi/ml) at 25°C. After incubation, the tissue was washed from non-incorporated [P^{33}] orthophosphate. To determine the time dependency of PLD activation, plant tissues were incubated with 0.8% butan-1-ol in the buffer in the dark prior to phytohormones or salt addition to the solution. The significant enhancement of PtdBut synthesis, as a marker of PLD activity, was detected as early as 5 min after the application of BA. This indicated the rapid activation of PLD in Amaranths tissues *in vivo* upon BA administration. Such rapid enhancement of PLD activity upon cytokinin treatment of plant tissues *in vivo* was demonstrated for the first time and provides a strong argument in favor of PLD participation in the molecular mechanism of cytokinin action. Thus our results strongly suggest that BA can activate PLD of the plant tissues. These phospholipases closely cooperate in the signaling network that additionally involve other lipid-signaling enzymes, first of all phosphatidylinositol kinases and phosphatases. We have shown that different isoforms of PLDs are activated under BA, salt and osmotic treatment. Alterations of different PLDs have resulted in the changes in PA production and cellular responses, indicating that different PLDs isoforms and corresponding PA species have unique functions. Thereby PLD lipid signaling is appearing to be the key mechanism that connects the stimulus perception at the cell membrane to intracellular actions and adequate metabolism responses.

This work was supported by the State Fund of Ukraine for fundamental research (№ 29.4/020-2009) and NAS of Ukraine (No5/1-09; 2.1.10.32-10).

References:

1. *Romanov GA, Kieber JJ, Schmülling T.* (2002) A rapid cytokinin response assay in Arabidopsis indicates a role for phospholipase D in cytokinin signaling. FEBS Lett 515: 39–43
2. *W. Zhang, C. Qin, J. Zhao, X.Wang* Phospholipase Dα1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (2004) 9508–9513.
3. *V. S. Kravets, S. V. Kretinin, Ya. S. Kolesnikov, I. A. Getman, and G. A. Romanov.* Cytokinins Evoke Rapid Activation of Phospholipase D in Sensitive Plant Tissues. Doklady Biochemistry and Biophysics, 2009, Vol. 428, pp. 264–267.
4. *V.S. Kravets, Ya.S. Kolesnikov, S.V. Kretynin, I.A. Getman, G.A. Romanov* // Rapid activation of specific phospholipase(s) D by cytokinin in *Amaranthus* assay system - Physiologia Plantarum, 2010, v. 22, N138, p. 249–255

ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ФОСФОЛИПАЗЫ D В КЛЕТКАХ АМАРАНТА В ХОДЕ ТРАНСДУКЦИИ СИГНАЛА ЦИТОКИНИНА

[1]Кравец В.С., [1]Кретинин С.В., [1]Колесников Я.С., [2]Романов Г.А.

[1]Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: kravets@bpci.kiev.ua
[2]Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

Одной из актуальных проблем современной биологии является изучение молекулярных механизмов рецепции гормонов и трансдукции сигналов, индуцированных их воздействием. Цитокинины являются одним из важнейших классов фитогормонов, играющих ключевую роль в регуляции роста и развития растений. Вместе с тем, вопросы реализации их биологического действия в клетке требуют дальнейших исследований.

Результаты анализа сигнальных систем клеток растений свидетельствуют о том, что фосфолипиды являются не только структурными компонентами мембран, но и предшественниками вторичных посредников внутриклеточной сигнализации. Фосфолипаза D (ФЛD) является важным компонентом трансдукции сигналов в клетках растений. Ранее нами была показана быстрая активация новообразования продукта ФЛD фосфатидилбутанола (в присутствии 1-бутанола в среде) в ответ на действие цитокининов в проростках амаранта (*Amaranthus caudatus* L.) *in vivo*, что свидетельствовало о быстрой активации определенной группы ФЛD [Kravets et al., 2010].

Целью представленной работы было продолжение исследования регуляции активности ФЛD в интактных растениях и при действии цитокининов, в системе *in vitro*. При изучении действия гормона семядоли проростков амаранта обрабатывали раствором цитокинина бензиладенина (5 мкМ БА) в течение 30 мин. Для анализа *in vitro* активности ФЛD проводили выделение плазматических мембран (ПМ) [**Ritchie, Gilroy, 2000]** и анализировали активность фермента по степени гидролиза меченного субстрата [метил-^{3}H]фосфатидилхолина] [Qin et al., 1997].

В результате исследования охарактеризованы некоторые свойства ФЛD из проростков амаранта. Оптимум активности ФЛD *in vitro* во фракциях ПМ находился в диапазоне микромолярных концентраций ионов кальция, тогда как в цитозольной фракции – в условиях миллимолярных концентраций этого иона. Проведен анализ активности ФЛD в присутствии ионов Ca^{2+} и липидных везикул, состоящих из фосфатидилинозитолбисфосфата (ФИФ$_2$), фосфатидилэтаноламина и фосфатидилхолина, в отсутствие SDS. Удельная активность *in vitro* ФЛD, зависимой от кофактора ФИФ$_2$, была значительно более низкой, чем ФИФ$_2$-независимая. Указанные свойства активности ФЛD в клетках амаранта соответствуют таковым для различных изоферментов, ранее обнаруженных у растений [Li et al., 2009].

Показано, что активация ФЛD цитокининами резко снижается с повышением концентрации неомицина, хелатора ФИФ$_2$. Это указывает на исключительную важность ФИФ$_2$ как кофактора изоформ ФЛD, стимулируемых цитокининами.

С целью установления локализации в клетках активности ФЛD, стимулируемой цитокининами, исследовали активность этого фермента в мембранной и растворимой фракциях при наличии или в отсутствии в среде инкубации ФИФ$_2$. Установлено, что цитокинины стимулируют ФЛD *in vitro* во фракциях плазматических мембран,, выделенных из проростков амаранта. Характер и уровень активации фермента *in vitro* имел аналогию к ответной реакцией ФЛD *in vivo*. Это свидетельствует о том, что плазматическая мембрана может обладать как системой рецепции цитокининов, так и компонентами, связывающими ее с активацией ФЛD.

Работа поддержана ГФФИ Украины (№ Ф29.4/019), НАН Украины (гранты 18-10 и ЦНП 9.1-07), НАН Украины и АН Чешской Республики (№5/1-2011), РФФИ (гранты 08-04-90429-Укр и 11-04-00614), Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Литература:

1. *V.S. Kravets, Ya.S. Kolesnikov, S.V. Kretynin, I.A. Getman, G.A. Romanov* // Rapid activation of specific phospholipase(s) D by cytokinin in *Amaranthus* assay system - Physiologia Plantarum, 2010, v. 22, N138, p. 249–255
2. *S. Ritchie, S. Gilroy* // Abscisic acid stimulation of phospholipase D in the barley aleurone is G-protein-mediated and localized to the plasma membrane - Plant Physiology, 2000, vol. 124, N2, p. 693–702
3. *W. Qin, K. Pappan, X. Wang* // Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD): cloning of PLDα and regulation of PLDα, -β, and -γ by polyphosphoinositides and calcium - J. Biol. Chem., 1997, vol. 272, N45, p. 28267–28273
4. *M. Li, Y. Hong, X. Wang* // Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants - Biochim. Biophys. Acta., 2009, vol. 1791, N9, p. 927–935

REGULATION OF PHOSPHOLIPASE D ACTIVITY *IN VITRO* IN AMARANTHUS DURING CYTOKININ SIGNAL TRANSDUCTION

[1]Kravets V.S., [1]Kretynin S.V., [1]Kolesnikov Ya.S., [2]Romanov G.A.

[1]Institute of bioorganic chemistry and petrochemistry NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: kravets@bpci.kiev.ua
[2]Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Elucidation of molecular mechanisms of hormone perception and signal transduction is the topical task of modern biology. Cytokinins are one of the most important classes of plant hormones that play a key role in growth and development. In the meantime, further investigations are needed to elucidate their biological action in cells.

Studies of plant cell signaling showed that phospholipids are not only structural components of membranes but also precursors of second messengers. Phospholipase D (PLD) is an important component of signal transduction pathways in plant cells. Earlier we have shown rapid accumulation of PLD product phosphatidylbutanol (in the presence of 1-butanol in incubation medium) in response to cytokinin in seedlings of amaranthus (*Amaranthus caudatus* L.) *in vivo* indicating rapid activation of specific class of PLD [Kravets et al., 2010].

The aim of the present work was to continue investigations concerning regulation of PLD activity in intact and cytokinin-treated plants, in *in vitro* system. For studies of the hormone action, cotyledons of amaranthus seedlings were treated with cytokinin benzyladenine (5 μM BA) for 30 min. Isolated plasma membrane (PM) [Ritchie, Gilroy, 2000] was assayed *in vitro* **for** hydrolytic activity of PLD towards its labeled substrate [methyl-^{3}H]phosphatidylcholine [Qin et al., 1997].

Some PLD properties in cells of amaranthus were determined. Optimal stimulation of PLD activity *in vitro* by calcium was achieved in PM fractions with micromolar-, whereas in cytosolic fraction – in millimolar concentrations. PLD activity was also studied *in vitro* in the presence of Ca^{2+} and lipid vesicles containing phosphatidylinositolbisphosphate (PIP_2), phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine in the absence of SDS. Specific activity of PLD, sensitive to PIP_2 co-factor, was noticeably lower than that of PIP_2-independent. These properties of PLD activity in amaranthus cells correspond well with different PLD isoforms found earlier in plants [Li et al., 2009].

It was also demonstrated that PLD activation by cytokinins was dramatically reduced by PIP_2-antagonist neomycin in a dose-dependent manner. This indicates a particular importance of PIP_2 as a co-factor of PLD isoform(s) stimulated by cytokinins.

In order to investigate cellular distribution of cytokinin-stimulated PLD, its activity in membranes and soluble fraction was studied in the presence or absence of PIP_2. It was found that cytokinins activated PLD *in vitro* in plasma membrane fraction isolated from amaranthus seedlings. Level and pattern of PLD activation *in vitro* reflected that of the enzyme response *in vivo*. This suggests that cytokinin perception machinery and signaling components leading to PLD activation are mainly associated with the plasma membrane.

This research was supported by NAS of Ukraine (5/1-09, 2.1.10.32-10), NAS of Ukraine and AS of Czech Republic (№5/1-2011), Russian Foundation of Basic Research (08-04-90429-Ukr and 11-04-00614), Program of Presidium RAS "Molecular and cell biology".

References:

1. *V.S. Kravets, Ya.S. Kolesnikov, S.V. Kretynin, I.A. Getman, G.A. Romanov* // Rapid activation of specific phospholipase(s) D by cytokinin in *Amaranthus* assay system - Physiologia Plantarum, 2010, v. 22, N138, p. 249–255
2. *S. Ritchie, S. Gilroy* // Abscisic acid stimulation of phospholipase D in the barley aleurone is G-protein-mediated and localized to the plasma membrane - Plant Physiology, 2000, vol. 124, N2, p. 693–702
3. *W. Qin, K. Pappan, X. Wang* // Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD): cloning of PLDα and regulation of PLDα, -β, and -γ by polyphosphoinositides and calcium - J. Biol. Chem., 1997, vol. 272, N45, p. 28267–28273
4. *M. Li, Y. Hong, X. Wang* // Phospholipase D- and phosphatidic acid-mediated signaling in plants - Biochim. Biophys. Acta., 2009, vol. 1791, N9, p. 927–935

ФИТОГОРМОНЫ И СВЕТ РЕГУЛИРУЮТ ДЕЭТИОЛЯЦИЮ ЯЧМЕНЯ

[1]Кравцов А.К., [2]Ефимова М. В., [2]Елисеева М.А., [1]Кулаева О.Н., [1]Кузнецов В.В.

[1]Учреждение Российской Академии наук Институт физиологии растений РАН, Москва, Россия
e-mail: ifr@ippras.ru
[2]Томского государственного университета, Томск, Россия.

Деэтиоляция – процесс перехода растения с роста в темноте к росту на свету, характеризующийся рядом физиологических, биохимических и морфологических изменений, которые проросток претерпевает в ответ на свет и которые приводят к накоплению хлорофилла и началу фотосинтеза. В работе изучено влияние света и фитогормонов (цитокинина (ЦК) и абсцизовой кислоты (АБК)) на экспрессию пластидных генов в ходе деэтиоляции однодольных растений (*Hordeum vulgare* L.). Ведущим фактором регуляции деэтиоляции является свет, однако его эффект на растение в значительной степени определяется эндогенными регуляторами, прежде всего фитогормонами.

Для изучения гормональной регуляции процесса деэтиоляции в работе рассматривается развитие растений не только на свету, но и на предшествующем этапе роста в темноте. По мере увеличения длительности роста ячменя в темноте наблюдалось постепенное снижение экспрессии пластидных генов и снижение способность растений к деэтиоляции, а после 12 дней пребывания в темноте наступала их необратимая этиоляция. ЦК совместно со светом сокращали период перехода ячменя на автотрофный тип питания; ускоряли накопление пигментов (Рис. 1), активировали экспрессию генов, продукты которых участвуют в биогенезе хлоропластов. Причем, для скорейшего процесса зеленения растений были необходимы, как свет, так и ЦК.

Нами доказано участие ЦК и АБК в регуляции экспрессии генов пластома в ходе деэтиоляции. Наряду со свето-зависимой регуляцией транскрипции генов впервые продемонстрирована свето-независимая активация ЦК транскрипции ряда пластидных генов в этиолированных проростках ячменя. Таким образом, впервые показано участие фитогормонов в процессе деэтиоляции однодольных растений [1].

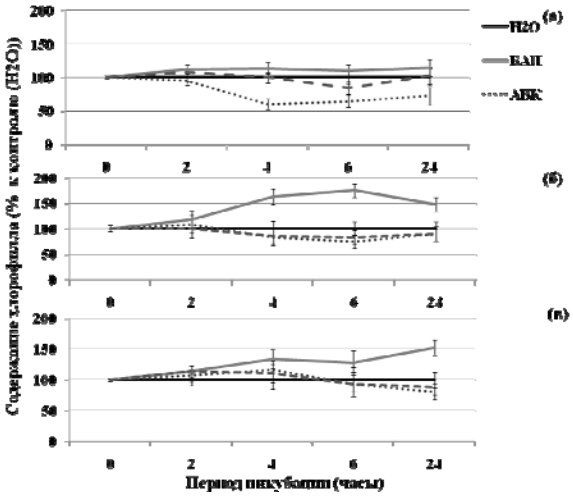


Рис. 1. Влияние БАП и АБК по отдельности, а также при их совместном действии на содержание хлорофилла на свету в листьях, отделенных от этилированных проростков ячменя разного возраста. Листья, отделенные от: (а) – 3, (б) – 6 и (в) – 9-дневных этиолированных проростков ячменя, инкубировали на свету (270 мкмоль м-2 с-1) на воде или растворах: АБК (7.6 х 10-5 М), БАП (2,2 х 10-5М) или БАП (2,2 х 10-5М) + АБК (4.4 х 10-5М) в течение 2, 4, 6 и 24 часов. На оси ординат приведены значения в процентах от содержания хлорофилла в контроле (вода). На рисунке приведены средние значения и их стандартные отклонения.

Работа выполнена при поддержи грантов РФФИ (проекты: 10-04-00594-а, 11-04-90732-моб_ст, 11-04-01008-а), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009 – 2013 годы» ГК №П209 23.04.2010.

Литература:

1. *Kravtsov A.K., Zubo Y.O., Kulaeva O.N., Yamburenko M.V. Kusnetsov V.V.* Cytokinin and abscisic acid control plastid gene transcription during barley seedling de-etiolation. Plant Growth Regulation. DOI: 10.1007/s10725-010-9553-y.

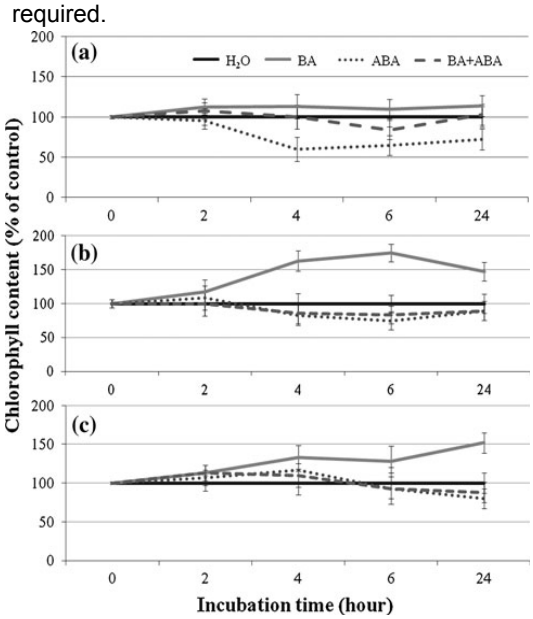
PHYTOHORMONES AND LIGHT: THE WAYS TO REGULATE DE-ETIOLATION OF BARLEY

[1]Kravtsov A.K., [2]Efimova M.V., [2]Eliseeva M.A., [1]Kulaeva O.N., [1]Kusnetsov V. V.

[1]Timiriazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
e-mail: ifr@ippras.ru
[2]Tomsk State University, Tomsk, Russia

De-etiolation is a set of physiological, biochemical, and morphological changes undergone by a seedling in response to transition from the growth in the dark to the light, which result in the chlorophyll accumulation and initiation of photosynthesis. We report here on the phytohormones (cytokinin (CK) and abscisic acid (ABA)) and light effects on expression of plastid genes in the course de-etiolation of monocot plants (*Hordeum vulgare* L.).The leading factor in regulation of greening is light. However its effect on a plant is presumably determined by endogeneous factors, the main of which are phytohormones.

To investigate hormonal regulation of greening, plant development was studied both in the light and at a preceding growth stage in the dark. As the time course of plant growth in the dark increased, the expression of plastid genes gradually declined, as well as the ability of a plant to green, and after 12 days of dark treatment the irreversible etiolation occurred. CK in the concert with light reduced duration of barley transition to autotrophic type of nutrition, enhanced pigment accumulation (**Fig 1.**) and activated expression of the genes the products of which participated in chloroplast biogenesis. For more rapid rates of plant greening both light and CK were required.



Hence, our data proves CK and ABA involvement in regulation of plastome gene expression while greening. Along with the light-dependent regulation of gene transcription we demonstrate(for the first time) light independent CK activation of transcription for a number of plastid genes in etiolated barley seedlings. Thus, this study reveals for the first time phytohormones involvement in the de-etiolation process of monocot plants [1].

Fig 1. Effects of BA, ABA, and their combination on greening of leaves detached from etiolated barley leaves. The leaves detached from 3- (a), 6- (b), and 9-day-old (c) etiolated barley seedlings were incubated in the light (270 lmol m^{-2} s^{-1}) on water, ABA (7.6 x 10^{-5} M), BA (2.2 x 10^{-5}M), or the combination of BA (2.2 x 10^{-5}M) and ABA (4.4 x 10^{-5} M) during 2, 4, 6, and 24 h. Percents of control values are presented on the ordinate axis. The means from three independent experiments ± SE are shown

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project nos.: 10-04-00594-a, 11-04-90732-моб_ст, and 11-04-01008-a) and contract No P209 23.04.2010 of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation

References:

1.*Kravtsov A.K., Zubo Y.O., Kulaeva O.N., Yamburenko M.V. Kusnetsov V.V.* Cytokinin and abscisic acid control plastid gene transcription during barley seedling de-etiolation. Plant Growth Regulation. DOI: 10.1007/s10725-010-9553-y.

ДОСЛІДЖЕННЯ ФОРМУВАННЯ HSP60-p70S6 КІНАЗНОГО КОМПЛЕКСУ В КАРДІОМІОЦИТАХ ПРИ СЕРЦЕВІЙ НЕДОСТАТНОСТІ

Крупська І., Капустян Л., Рожко О., Бобик В., Яковенко Л., Сидорик Л.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна
e-mail: i.v.kroupskaya@imbg.org.ua

Молекулярні шаперони (HSP) відомі як кардіопротекторні білки, які відіграють ключову роль у регуляції виживання або загибелі кардіоміоцитів. Hsp60, основний шаперон мітохондрій, привертає останнім часом особливу увагу, завдяки специфічним функціям і локалізації близько 20-30% його клітинного вмісту у цитоплазмі кардіоміоцитів.

Нещодавно на культивованих ембріональних кардіоміоцитах було показано, що молекулярний шаперон Hsp60 здатний формувати комплекси з про-апоптичними білками Bax і Bak, що не дозволяє їм приймати участь в індукції програми апоптозу. Зменшення рівня експресії Hsp60 в кардіоміоцитах результується в транс локації білку Bax до мітохондрії, формування мембранних пор і запуску апоптозу.

В той же час, p70S6 кіназа, один з критичних для клітинного росту і проліферації білків, залучена до контролю трансляції шляхом фосфорилювання S6 білку малої 40S субчастинки рибосом. Нещодавно було ідентифіковано інший субстрат фосфорилювання p70S6K – проапоптичний білок BAD, який кіназа фосфорилює за залишками Ser^{112} - and $Ser^{136.}$

На основі даних біоінформатичного пошуку спільних доменів взаємодії, ми припустили, що Hsp60 та p70S6K може формувати *in vivo* комплекс, який важливий у регуляції стрес-індукованих сигнальних шляхів апоптозу в кардіоміоцитах. Ідентифікацію формування можливого комплексу між Hsp60 і p70S6K *in vivo* проводили в ушкодженому ДКМ міокарді людини і на серцях мишей з експериментальним ДКМ-подібним індукованим ушкодженням міокарду. За допомогою методу ко-імунопреципітації вперше ідентифіковано *in vivo* взаємодію між Hsp60 і p70S6K в нормальному і ДКМ-ушкодженому міокарді людини, а також у міокардах мишей з експериментальною патологією.

Подальші детальні дослідження дозволять встановити молекулярні механізми формування цих комплексів і їх роль у де-регуляції нормальної антистресової відповіді кардіоміоцитів, що призводить до запуску апоптозу, характерного для прогресії серцевої недостатності.

THE STUDY OF Hsp60-p70S6 KINASE COMPLEX FORMATION IN CARDIOMYOCYTES AT HEART FAILURE

Kroupskaya I., Kapustian L., Rozhko O., Bobyk V., Yakovenko L., Sidorik L.

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: i.v.kroupskaya@imbg.org.ua

Molecular chaperones (HSP) are known as cardioprotective proteins and key regulators of apoptotic death or survival in cardiomyocytes. Hsp60, the main mitochondrial chaperone, is of special interest since recent data evidence the special function and the location of 10-30% of such protein in cytoplasm of cardiomyocytes.

Recently it has been shown on the cultured neonatal cardiomyocytes that molecular chaperone Hsp60 is capable to form complexes with proapoptotic proteins Bax and Bak, not allowing them to precipitate the apoptosis. The decrease in Hsp60 expression level in cardiomyocytes resulted in translocation of Bax protein to mitochondria and launch of apoptosis.

On the other hand p70S6 kinase is one of the crucial protein required for cell growth and G1 cell cycle progression. p70S6 kinase phosphorylates the S6 protein of the 40S ribosomal subunit and is involved in translational control. Recently the pro-apoptotic molecule BAD was identified as one of the main p70S6K targets phosphorylated on the Ser^{112} - and Ser^{136} –residues.

We supposed that Hsp60 and p70S6K could form in vivo complex which plays a crucial role in regulation of stress-induced apoptotic signal pathways in cardiomyocytes. The identification of possible Hsp60-p70S6K complex formation *in vivo* have been done in the human myocardia (DCM-affected and normal ones) and in the mice hearts with experimental inducible heart failure. Co-immunoprecipitation method study firstly identified the *in vivo* interaction between Hsp60 and p70S6K in normal and DCM-affected human myocardium as well as in the hearts of animals with experimental pathology. The mechanism of such complexes formation should be elucidated. We presume that Hsp60 is a general connecting-link in the regulation of cardiomyocytes apoptotic signalling at heart failure progression.

ЭНДОГЕННЫЕ ОЛИГОСАХАРИНЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ РАСТЕНИЙ – РЕГУЛЯТОРЫ ПРОЦЕССА КОРНЕОБРАЗОВАНИЯ

Ларская И.А., Барышева Т.С., Заботин А.И.

Учреждение Российской академии наук Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, Казань, Россия
e-mail: pzl@mail.ru

Показано что клеточные стенки растений продуцируют большое количество низкомолекулярных фрагментов, которые могут функционировать как сигнальные молекулы. Вся предварительная информация о биологически активных олигосахаридах (= олигосахаринах) была получена из работ, в которых исследовались эффекты олигосахаридов, образованных в результате кислотного или ферментативного гидролиза клеточных стенок либо полученных синтетическим путем.

В коллективе была разработана методика многоступенчатого хроматографирования по извлечению активных внутриклеточных фракции олигосахаринов без предварительного гидролиза полисахаридов клеточных стенок, где вместо гидролизата использовался буферорастворимый экстракт из проростков гороха. В результате были получены нейтральные олигосахариды, имеющие степень полимеризации 12-14 и состоящие преимущественно из арабинозы, глюкозы и галактозы. Полученные олигосахарины стимулировали образование адвентивных корней на тонкослойных эксплантах из гипокотилей гречихи даже в отсутствии экзогенной добавки гормона. Активная фракция олигосахаридов после нескольких этапов хроматографирования, была очищена до единичного пика. Обработка очищенного олигосахарина смесью целлюлаз полностью уничтожала их активность, тогда как обработка протеазой или нагреванием не оказывала эффекта. Исследование динамики накопления активного олигосахарина показало, что он существует и в листьях и корнях проростков гороха на протяжении всего периода формирования у них корневой системы.

Различные комбинации по времени и порядку внесения олигосахарина и ИУК в среду культивирования эксплантов позволили выявить в процессе формирования корней временные интервалы, которые характеризуются дифференциальной чувствительностью к этим эффекторам. Для получения наибольшего эффекта олигосахарина он должен вноситься в среду до гормона, в период, когда экспланты наименее чувствительны к ИУК. Протяженность этих временных интервалов зависела от типа экспланта и составляла от нескольких часов (гипокотили гречихи) до нескольких дней (листья табака). Использование трансгенных (RolB::GUS) растений табака показало, что добавление олигосахарина в среду культивирования до гормона также повышало активность глюкуронидазы и ускоряло время ее появления. Поскольку экспрессия репортерного (GUS) гена также как и экспрессии генов, ответственных за ризогенез являются ИУК-зависимыми, то очевидно, что активация образования корней на эксплантах под действием олигосахарина, обусловлено увеличением числа инициальных клеток.

В настоящее время проводятся работы по определению структуры активного олигосахарина.

THE ENDOGENOUS PLANT CELL WALL OLIGOSACCHARINS ARE REGULATORS OF THE PROCESS OF RHIZOGENESIS

Larskaya I.A., Barisheva T.S., Zabotin A.I.

Establishment the Russian Academy of Sciences the Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics KazSC the Russian Academy of Science, Kazan, Russia
e-mail: pzl@mail.ru

It was shown that plant cell walls are producing a lot of low-molecular fragments which can function as signaling molecules. All previous information about biologically active oligosaccharides (= oligosaccharins) has been received from works in which effects of the oligosaccharins obtained as a result of acid or enzymatic hydrolysis of cell wall or received by synthetic way were investigated.

The technique of the multistage of chromagraphies on the extraction of active fractions of the oligosaccharins without preliminary hydrolysis cell wall polysaccharides where instead of hydrolysate it was used buffer soluble extract from the pea seedlings has been developed in our team. As result have been received neutral oligosaccharins with degree of polymerization of 12-14 and consisting mainly from glucose, galactose and arabinose. The received oligosaccharins are stimulated the adventitious root formation on thin-layer explants from buckwheat hypocotyls even in absence of exogenous hormone. The active fraction of oligosaccharide was purified to a single peak after a series of chromatographies. Treatment of the purified oligosaccharin with a mixture of cellulases completely abolished its activity, while treatment with protease or heating had no effect. Research of dynamics of accumulation active oligosaccharin has shown that it exists in leaves and roots of pea seedlings during all period of root system formation.

The various combinations on time and the order of entering oligosaccharins and IAA to the medium of culture of explants have allowed revealing the time intervals which are characterized by differential sensitivity to effectors during root formation. For reception of the greatest effect of oligosaccharin it should be brought at medium up to a hormone, during the period when explants are least sensitive to IAA. The extent of these time intervals depend on type of explant and made from several hours (buckwheat hypocotyls) about several days (leaves of tobacco). The use of transgene tobacco plants (RolB:: GUS) has shown, that addition of oligosaccharin to medium of culture up to a hormone also raised the glucuronidase activity and accelerated time of its occurrence. As expression of reporter gene (GUS) as well as expression the genes responsible for rooting are IAA-dependent it is obvious that activation of root formation on explants by oligosaccharin action is caused by increase in number initial cells.

At present the works by definition of the active oligosaccharin structure are carried out.

МОНОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОСФОЛИПИДНЫЕ ПЛЕНКИ ЛЭНГМЮРА КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С БИОМЕМБРАНАМИ

Ляхов А.М., Прокопенко В.В., Могилевич С.Е.

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: alexey@bpci.kiev.ua

При изучении взаимодействия биологически активных веществ (БАВ) с клеточными мембранами исследователи, как правило, уделяют внимание закономерностям влияния препаратов на белковые компоненты, хотя известно, что регуляторное действие БАВ на клетку в значительной степени обусловлено их влиянием на липидный матрикс биомембран. Как неспецифическое действие, так и некоторые элементы специфического влияния лекарственных средств и БАВ на клетку могут быть связаны с взаимодействием препаратов с фосфолипидами, которые играют важную роль в клеточной сигнализации. В работах отдела медико-биологических исследований развивается концепция биорегуляторной стереотипии, в соответствии с которой большинство БАВ можно разделить на две группы: 1) активаторы аденилатциклазной и/или блокаторы полифосфоинозитидной сигнальных систем клетки и 2) ингибиторы аденилатциклазного и/или активаторы полифосфоинозитидного сигнальных каскадов. Определение биорегуляторного стереотипа БАВ на молекулярных и клеточных моделях является сложной экспериментальной задачей, требующей большого количества биологического материала, поэтому целью настоящего исследования являлся поиск простого метода, позволяющего выявить биорегуляторный стереотип БАВ.

Одним из методов моделирования мембран являются лэнгмюровские монослойные пленки амфифильных липидов, сформированные на поверхности гидрофильной среды. Мы изучили взаимодействие с монослоями из дистеароилфосфатидилхолина и лецитина БАВ известных модуляторов сигнальных каскадов, а также суфана, спленозида, яктона, бемитила и АТФ-ЛОНГа. Опыты проводили на ленгмюровской ванне объемом 120 мл. Субфаза - 5 мМ буферный раствор трис-НС1, pH 7,4, в котором растворены БАВ (10^{-4} М). Рассчитывались площадь, занимаемая одной молекулой липида в монослое при нулевом поверхностном давлении, параметры, характеризующие энергию взаимодействия субфаза-субфаза, субфаза-липид и липид-липид, и изменение свободной энергии поверхности в присутствии липида (ΔG). Для интегральной оценки направленности действия БАВ на монослои были использованы метод кластерного анализа и искусственные нейронные сети с прямой передачей сигнала и обратным распространением ошибки.

В результате анализа влияния БАВ на параметры монослоев препараты разделились на две группы: активаторы аденилатциклазной и/или блокаторы полифосфоинозитидной сигнальных систем, и БАВ с противоположным действием на данные сигнальные каскады.

Произведен прогноз биорегуляторного стереотипа БАВ, влияние которых на сигнальные системы ранее не исследовалось. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что кардиотонические препараты суфан и спленозид могут выступать как активаторы аденилатциклазной и/или блокаторы полифосфоинозитидной сигнальных систем, а энергодающий препарат АТФ-ЛОНГ, актопротекторы бемитил и яктон – проявлять противоположное действие по отношению к сигнальным каскадам. Таким образом, фосфолипидные лэнгмюровские монослои, в сочетании с методами кластерного анализа и искусственных нейронных сетей, могут быть тестовой системой для прогнозирования биорегуляторного стереотипа БАВ.

MONOLAYER PHOSPHOLIPID LANGMUIR FILMS AS MODEL FOR STUDY ON INTERACTION OF DRUGS WITH BIOMEMBRANES

Lyakhov A.M., Prokopenko V.V., Mogilevich S.Ye.

Institute of Bioorganic chemistry and Petrochemistry of NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: alexey@bpci.kiev.ua

When studying the interaction of biologically active substances (BAS) with cell membranes, researchers tend to pay attention to patterns of influence of drugs on the protein components, although it is known that the regulatory action of BAS on a cell is largely attributable to their influence on the lipid matrix of biomembranes. As a nonspecific action, and some elements of the specific influence of drugs and biologically active substances to cells may be related to the interaction of drugs with phospholipids, which play an important role in cell signaling. In the department of biomedical research develops the concept bioregulatory stereotypes according to which the majority of biologically active substances can be divided into two groups: 1) activators of adenylate cyclase and / or polyphosphoinositide cellular signaling systems and 2) inhibitors of adenylate cyclase and / or activators polyphosphoinositide signaling cascades. Determination bioregulatory stereotype of drugs at the molecular and cellular models are complex experimental task, requiring a large amount of biological material, so the objective of this study was to find a simple method to identify bioregulatory stereotype of BAS.

One method of modeling the membranes are Langmuir monolayer films of amphiphilic lipids formed on the surface of the hydrophilic agent. The interaction well-known modulators of signaling cascades with monolayers of the interaction well-known modulators of signaling cascades and sufan, splenoside, yakton, bemithyl and ATP-LONGE with monolayers of lecithin and table was studied and lecithin were studied. Experiments were performed on Langmuir trough volume of 120 ml. Subphase - 5 mM buffer Tris-HC1, pH 7.4, in which solved of BAS (10-4 M). The area occupied by one molecule of lipid in the monolayer at zero surface pressure, the parameters characterizing the interaction energy of the subphase-subphase, the subphase-lipid and lipid-lipid, and free energy change of the surface in the presence of lipid (ΔG) were calculated. For the integral assessment of the direction of BAS in the monolayers the method of cluster analysis and artificial neural network with a direct transmission signal and back propagation of errors were used.

An analysis of the influence of BAS on the parameters of monolayers drugs are divided into two groups: activators of adenylate cyclase and / or polyphosphoinositide cellular signaling systems, and biologically active substances with opposite effects on these signaling cascades.

The forecast at bioregulatory stereotype of BAS, whose influence on the signaling system has not previously been investigated, was produced. The data obtained suggest that cardiac medications sufan and splenoside can act as activators of adenylate cyclase and / or polyphosphoinositide cellular signaling systems, but ATP-LONG, actoprotektors yakton and bemithyl - to show the opposite effect with respect to the signaling cascades. Thus, the phospholipid Langmuir monolayers, in conjunction with the methods of cluster analysis and artificial neural networks can be a test system for predicting bioregulatory stereotype of BAS.

ПРОТЕКТОРНА РОЛЬ САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ У ФОРМУВАННІ СТІЙКОСТІ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ДО ДІЇ ПОСУХИ

Маменко Т.П., Ярошенко О.А.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ, Україна
e-mail: mamenko@optima.com.ua

Саліцилова кислота (СК) – є одним із ключових регуляторів захисних реакцій рослин за дії стрес-факторів біотичної і абіотичної природи. Вона здатна виступати в ролі первинного сигналу і, зв'язуючись з рецепторними білками плазмалеми, включати відповідні сигнальні системи, що призводить до синтезу захисних сполук і формування стійкості рослин до несприятливих умов середовища [1, 2].

Метою нашої роботи було вивчити протекторну роль СК у формуванні стійкості сортів озимої пшениці різних екотипів до дії тривалої посухи.

Дослідження проводились на контрастних за стійкістю до посухи сортах озимої пшениці, які вирощували за різних умов водозабезпечення. Обробку рослин водним розчином СК у концентрації 0,25 мМ проводили перед припиненням поливу рослин до 30 % від повної вологоємкості (ПВ) – модельна посуха. Контролем слугували не оброблені СК рослини, які вирощували за оптимального водозабезпечення (60 % ПВ).

Встановлено, що обробка рослин СК за дії посухи у чутливі до нестачі вологи фази онтогенезу сприяла оптимізації водного статусу сортів озимої пшениці – зниженню водного дефіциту, підвищенню оводненості і водного потенціалу у листках. Виявлено, що стабілізація водного статусу сортів озимої пшениці за дії СК була обумовлена підвищенням показників водозатримувальної та водовідновлювальної здатності клітин, з одного боку, та збереженням цілісності клітинних мембран, з іншого, за дефіциту вологи.

Досліджено, що обробка рослин СК призводить до зниження інтенсивності окиснювальних процесів у сортів озимої пшениці за умов посухи, про що свідчить зниження рівня пероксиду водню і малонового диальдегіду у листках. Водночас за дії СК відбуваються адаптаційні зміни активності антиоксидантних ферментів у листках рослин, що сприяло підвищенню стійкості сортів озимої пшениці до дефіциту вологи. Зокрема, обробка озимої пшениці СК за тривалої дії посухи призводила до підвищення активності гваяколпероксидази і каталази у листках, а також стабілізації активності супероксиддисмутази і аскорбатпероксидази до рівня контролю. Зафіксовані зміни активності антиоксидантних ферментів за дії СК відбувалися на фоні онтогенетичної мінливості активності ферментів у рослин, які зростали в оптимальних умовах поливу. Виявлено, що у оброблених СК сортів озимої пшениці пул низькомолекулярних антиоксидантів (аскорбату, глутатіону і каротиноїдів) наближувався до рівня контрольних рослин, що сприяло підвищенню стрес-захисних властивостей рослин.

Показано, що оптимізація водного статусу і перебіг антиоксидантних процесів за дії СК на рослини озимої пшениці у чутливі до нестачі вологи фази онтогенезу сприяли підвищенню посухостійкості сортів та зменшенню втрат врожаю зерна за умов посухи.

Таким чином обробка рослин СК індукує зниження інтенсивності окиснювальних процесів, стабілізацію активності антиоксидантних ферментів і пулу низькомолекулярних антиоксидантів у листках, результатом чого є оптимізація водного статусу, збереження цілісності клітинних мембран та підтримання нормального гомеостазу клітин у сортів озимої пшениці в умовах посухи.

Література:

1. *Agarwal S., Sairam R, Srivastava G, Meena R.* Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes // Biologia Plantarum. – 2005. – T. 49, № 4. - P. 541-550.
2. *Kawano T., Furuichi T., Muto S.* Controlled salicylic acid levels and corresponding signaling mechanisms in plants // Plant Biotechnology. – 2004. – 21, № 5. – P. 319-335.

PROTECTIVE ROLE OF SALICYLIC ACID IN FORMATION OF WINTER WHEAT RESISTANCE FOR DROUGHT ACTIONS

Mamenko T. P., Yaroshenko O. A.

Institute of Plant Physiology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: mamenko@optima.com.ua

Salicylic acid (SA) - is one o f the key regulators of protective reactions of plants under action stress-factors of biotic and abiotic nature. It can serve as the primary signal and binding with receptor proteins plasmalemma, to incorporate the signaling system that leads to the synthesis of protective compounds and formation of plant resistance to adverse environmental conditions [1, 2].

The aim of our study was to examine the protective role of SA in resistance formation of winter wheat cultivars of different ecotypes to the prolonged drought actions.

Research conducted at the contrast on drought resistant varieties of winter wheat are grown under different conditions of water supply. The treatment of plants with water solution SA in concentration 0.25 mM was performed before the termination of watering of plants up - a model drought. Served as a control not treated with SA plants that grew at the optimal water supply.

Found that treatment of plants by SA under drought actions in the sensitive to moisture phase of ontogenesis has promote the optimization of water status in winter wheat cultivars - reducing of water deficit, increasing of water contents and water potential in leaves. Revealed that the stabilization of water status of winter wheat cultivars for the actions of SA was determined by increasing rates of water-detention and water-reduction ability of cells on the one hand and preserving the integrity of cell membranes, on the other hand the deficiency of moisture.

Investigated the treatment of plants by SA leads to decrease in the intensity of oxidative processes in winter wheat cultivars under drought conditions, as evidenced by reduction the contents of hydrogen peroxide and malondialdehyde in leaves. However, for actions of SA occur adaptive changes of antioxidant enzymes activity in leaves of plants, which contributed to increase the resistance of winter wheat cultivars to moisture deficiency. In particular, winter wheat treatment by SA for prolong action of drought resulted in increased activity of guaiacol-peroxidase and catalase in leaves, as well as stabilization activity of superoxide dismutase and ascorbate-peroxidase to the level of control. Observed changes of antioxidative enzymes activity for the actions of the SA took place against a background of ontogenetic variability of enzyme activity in plants grown in optimum conditions of irrigation. Found that in treated by SA winter wheat cultivars pool of low molecular antioxidants (ascorbate, glutathione and carotenoids) was near to the level of control plants, which contributed to higher stress-protective properties of plants.

Shown that optimization of water status and course of antioxidant processes for SA actions to winter wheat plants in a the sensitive to moisture phase of ontogenesis which contributed to increase the drought resistance cultivars and reduce grain yield losses under drought conditions.

Thus the treatment of plants by SA induces a decrease of oxidative processes intensity, stabilization of antioxidative enzymes activity and low-antioxidants pools in leaves, resulting in optimization of water status, maintain the integrity of cell membranes and maintaining normal cell homeostasis in winter wheat cultivars in drought conditions.

References:

1. *Agarwal S., Sairam R, Srivastava G, Meena R.* Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes // Biologia Plantarum. – 2005. – T. 49, № 4. - P. 541-550.
2. *Kawano T., Furuichi T., Muto S.* Controlled salicylic acid levels and corresponding signaling mechanisms in plants // Plant Biotechnology. – 2004. – 21, № 5. – P. 319-335.

ФАКТОР ПЕРЕНОСУ ІМУННОЇ РЕАКТИВНОСТІ ДО CANDIDA – ЕФЕКТИВНИЙ МОДУЛЯТОР ГАЛЬМІВНОЇ ДІЇ НЕЙРОМЕДІАТОРІВ НА ГЛАДЕНЬКІ М'ЯЗИ КИШЕЧНИКУ

Меленевська Н.В., Мірошниченко М.С., Цимбалюк О.В., Давидовська Т.Л., Любченко Г.А.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail: nadiadvd@yahoo.com

Методом одинарного "сахарозного містка" та тензометрії досліджували вплив фактора переносу (ФП) імунної реактивності, індукованого Candida на пуринергічне та NO-ергічне гальмування гладеньких м'язів taenia coli. Встановлено, що ця імуноактивна субстанція в діапазоні концентрацій 10^{-6} – 10^{-4} мг/мл не викликала змін мембранного потенціалу мембрани гладеньком'язових клітин, але спричиняла модулюючу дію на спонтанну електричну та скорочувальну активність гладеньком'язових смужок (ГМС): відбувалось збільшення у порівнянні з контролем величини повільних хвиль деполяризації, частоти, амплітуди спонтанних потенціалів дії та спонтанних скорочень гладеньком'язових смужок (Рис.1, 1-2). Більше, ніж у два рази зменшувався час формування повільних хвиль деполяризації. У наступному, амплітуда повільних хвиль деполяризації зменшувалась, але збільшувалась частота їх повторень (Рис.1, 2). За цих умов м'язовий тонус ГМС залишався без змін. Встановлено, що за дії фактора переносу відбувається зменшення у порівнянні з контролем величини K^+-індукованої деполяризації гладеньких м'язів. Дослідження кумулятивної дії цієї імуноактивної субстанції на АТФ-викликану гіперполяризацію мембрани ГМК taenia coliпоказало, що ФП в концентрації 10^{-6} мг/мл підсилював АТФ-викликану гіперполяризацію мембрани ГМК ($\overline{\Delta}$ =(166±11)%, n=7, P<0,05); при концентрації субстанціях субстанції 10^{-5}, 10^{-4} мг/мл – $\overline{\Delta}$ =(97±6)%, n=7, P<0,05 та (54±3)%, n=7, P<0,05, відповідно. За цих умов змінювалась кінетика АТФ-індукованої гіперполяризації мембрани ГМК.

В дослідах також встановлено, що фактор переносу усував гіперполяризуючу дію нітропрусиду натрію на гладеньком'язові смужки. Деполяризація та скорочення, викликані ацетилхоліном на тлі дії нітропрусиду натрію, посилювались субстанцією (Рис. 2).

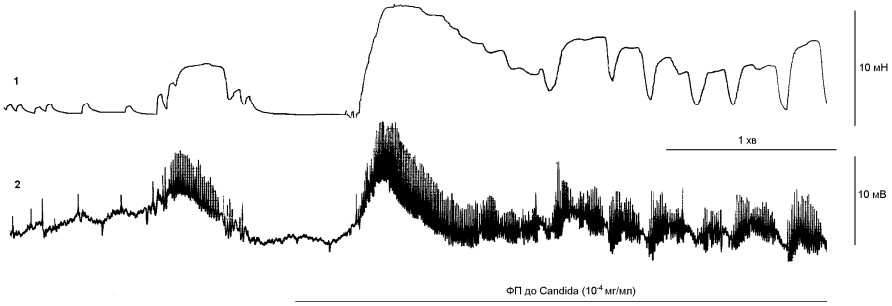


Рис.1 Дія фактора переносу (ФП) імунної реактивності, індукованого Candida на спонтанну електричну (2) та скорочувальну (1) активність гладеньких м'язів taenia coli.

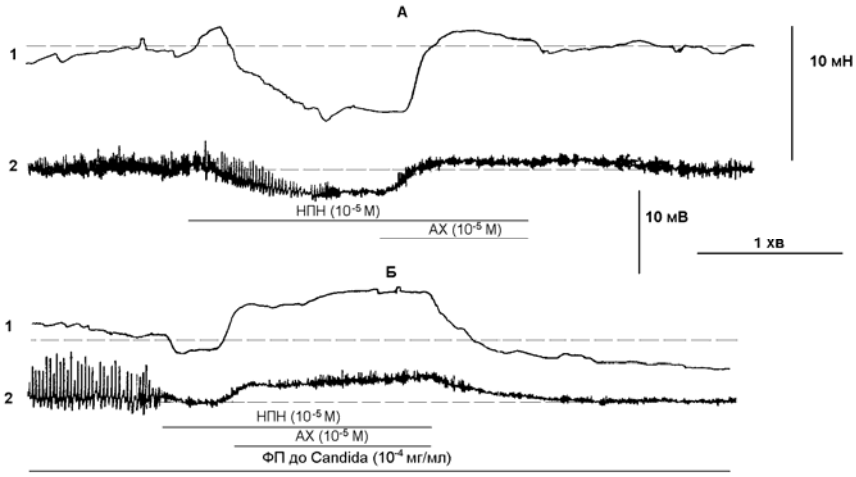


Рис. 2 Дія фактора переносу (ФП) імунної реактивності, індукованого Candida на викликану нітропрусидом натрію (НПН, 10^{-5} М) гіперполяризацію (2) та розслаблення (1) гладеньких м'язів taenia coli: А – контроль; Б – за дії ФП в концентрації 10^{-4} мг/мл. На тлі НПН аплікація ацетилхоліну (АХ, 10^{-5} М) в контролі (А); Б – за дії ФП до Candida в концентрації 10^{-4} мг/мл, відповідно. Час аплікації субстанції становив 15 хв.

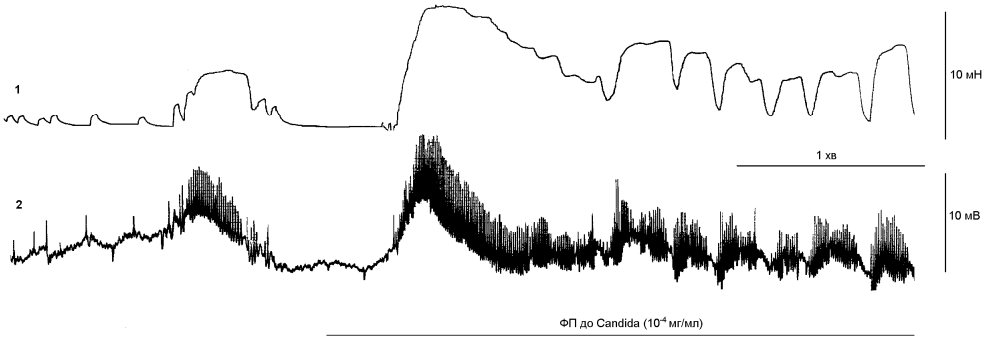
TRANSFER FACTOR OF IMMUNE REACTIVITY TO CANDIDA – EFFECTIVE MODULATOR OF INHIBITING NEUROMEDIATORS IN GUT SMOOTH MUSCLES

Melenevska N.V., Miroshnichenko M.S., Tsymbalyuk O.V., Davidovska T.L., Lyubchenko G.A.

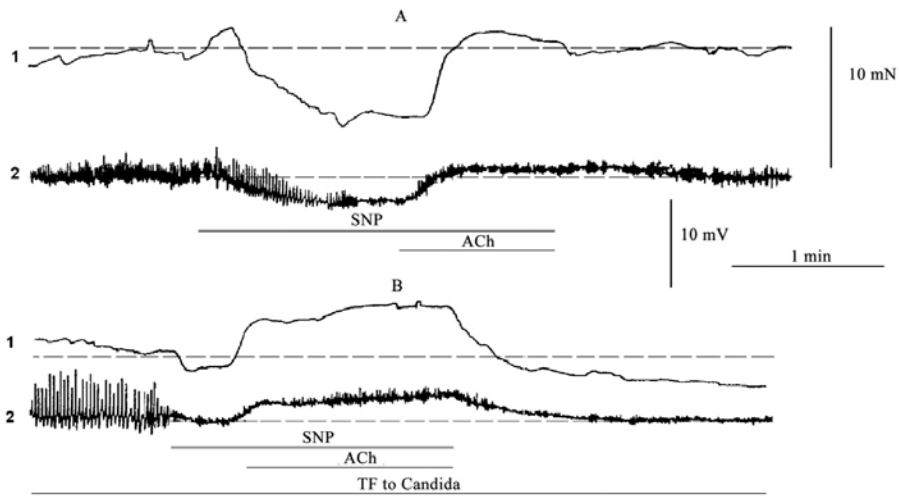
Kyiv national Taras Shevchenko university, Kyiv, Ukraine
e-mail: nadiadvd@yahoo.com

The action of transfer factor of immune reactivity to Candida on NO-inhibition in taenia coli smooth muscles was investigated using "sucrose-gap" technique and tension measuring. This immune-active substance in concentrations 10^{-6} – 10^{-4}mg/ml doesn't change the membrane potential in smooth muscle cells, but modulates spontaneous contractile and electric action of smooth muscle stripes (SMS): amplitude values of depolarization slow waves, frequency and amplitude of spontaneous action potentials and spontaneous contraction increase comparing with control measurements **(Pic.1,1-2)**. The time of forming the slow waves decreases in more than twice. The amplitude of depolarization slow waves decreases, whereas its frequency increases **(Pic.1,2)**. Under these conditions the muscle tone of SMS doesn't change. Transfer factor decreases the value of K^+-induced depolarization of smooth muscle. The dose-dependent effects of this immune substance action on ATP-invoked hyperpolarization of taenia coli SMC membrane demonstrate, that TF in 10^{-6} mg/ml enhances ATP-evoked membrane hyperpolarization of SMC (($\overline{\Delta}$ =(166±11)%, n=7, P<0,05); concentrations: 10^{-5}, 10^{-4} mg/ml – $\overline{\Delta}$ =(97±6)%, n=7, P<0,05 and (54±3)%, n=7, P<0,05, correspondingly). Under these conditions the kinetics of ATP-induced hyperpolarization of SMC changes.

The transfer factor was also showed to remove the hyperpolarizing action of sodium nitroprusside on smooth muscle stripes. Depolarization and contraction, evoked with acetylcholine on a background of sodium nitroprusside action, is enhanced by this substance action.



Pic.1 The action of transfer factor (TF) of immune reactivity to Candida(10^{-4}mg/ml) on spontaneous electrical (2) and contractile (1) activity of taenia coli smooth muscles.



Pic.2 The action transfer factor (TF) of immune reactivity to Candida on sodium nitroprusside-evoked (SNP, 10^{-5}M) hyperpolarization (2) and relaxation (1) of taenia coli smooth muscles: A – control, B – under TF (10^{-4} mg/ml). On the background of acetylcholine application (Ach, 10^{-5}M) in control (A); B – under TF to Candida action in concentration 10^{-4}mg/ml, correspondingly (application time 15 min).

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ТИАМИНА КАК ЭФФЕКТОРЫ ТИАМИНЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ В НЕРВНОЙ КЛЕТКЕ

[1]Пархоменко Ю.М., [2]Вовк А.И., [1]Степаненко С.П., [1]Чеховская Л.И., [1]Чорный С.А., [1]Донченко Г.В.

[1]Институт биохимии им. А.В. Палладина НАНУ, Киев, Украина
e-mail: yupark@biochem.kiev.ua
[2]Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: vovk@iboc.kiev.ua

История развития витаминологии свидетельствует, что синтетические производные витаминов являются удобным инструментом в изучении молекулярных механизмов их функционирования в живых клетках, а также неиссякаемым источником создания новых терапевтических препаратов целенаправленного действия. С целью поиска перспективных нейроактивных соединений на основе производных витамина B_1 (тиамина) было исследовано действие различных его производных, как классических антагонистов (ампролиум, окситиамин, пиритиамин), так и новых соединений, синтезированных на основе тиазолиевого компонента тиамина, на ключевые тиаминзависимые реакции в нервных клетках.

Способность вышеуказанных производных тиамина взаимодействовать с клеточными структурами, принимающими участие в обмене или функционировании тиамина, изучали на различных модельных системах: частично очищенные протеины, субклеточные структуры, изолированные нервные терминали (синаптосомы), клеточные культуры. В своих исследованиях мы акцентировали внимание на таких параметрах, как поглощение и связывание тиамина синаптосомами, тиаминсвязывающая и тиаминтрифосфатазная активности тиаминсвязывающего протеина плазматических мембран синаптосом, активность тиаминкиназы (КФ 2.7.6.2) - энзима, который отвечает за синтез тиаминдифосфата (ТДФ), активность ТДФ-зависимых ферментов, в частности – пируватдегидрогеназного комплекса (ПДК). Сравнение кинетических параметров ингибирования исследуемыми производными тиамина реакций обмена тиамина в синаптосомах и действия этих производных на выживание нейрональных клеток позволило выявить в метаболизме тиамина критические звенья, подавление активности которых инициирует гибель клеток. Такими звеньями, согласно нашим выводам, является тиаминсвязывающий протеин плазматической мембран и тиаминкиназа.

Учитывая выявленную нами ранее способность тиамина оказывать модулирующее действие на синтез ацетилхолина (АХ), опосредованное действием ТДФ и тиаминтрифосфата на активносить регуляторных ферментов ПДК и, соответственно, на активность ПДК [1], мы изучали также влияние производных тиамина на включение радиометки из меченого по углероду пирувата в АХ. В опытах на синаптосомах, изолированных из мозга нормальных и B_1-недостаточных крыс, выявлена однонаправленность действия тиамина и его антагониста – окситиамина на активность ПДК и синтез АХ из пирувата, что подтверждает некоферментный механизм действия тиамина на вышеуказанные процессы.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что наиболее перспективными как эффекторы тиаминзависимых процессов являются производные тиамина, которые содержат тиазолиевый цикл с незамещенным гидроксиэтильным радикалом аналогичный тому, который присутствует в молекуле тиамина, способны проникать через плазматическую мембрану, и фосфорилироваться цитозольной тиаминкиназой или взаимодействовать с ней, влияя на обмен внутриклеточного пула тиаминфосфатов. Изучение фармакологической активности этих соединений или их гомологов может привести к созданию новых эффективных средств для лечения или предупреждения нейродегенеративных заболеваний.

Литература:

1.*Ю.М. Пархоменко, И.Ю Черныш, Т.Я. Чурилова, А.Г. Халмурадов* // Влияние тиаминфосфатов на активность регуляторных ферментов пируватдегидрогеназного комплекса. - Укр. Биохим. журн., 1987, 59, № 6, с. 49-54

SYNTHETIC DERIVATIVES OF THIAMINE AS EFFECTORS OF THIAMINE DEPENDENT PROCESSES IN NERVE CELLS

[1]Parkhomenko Yu.M., [2]Vovk A.I., [1]Stepanenkoo S.P., [1]Chekhovskaya L.I., [1]Chornyy S.A., [1]Donchenko G.V.

[1] A.V.Palladin Institute of Biochemistry NAS of Ukraine, Kiev; Ukraine
e-mail: yupark@biochem.kiev.ua
[2]Institute of Bioorganic chemistry and Chemistry of oil NAS of Ukraine,
e-mail: vovk@iboc.kiev.ua

History of vitaminology indicates that synthetic derivatives of vitamins are a convenient tool for studying the molecular mechanisms of their function in living cells, as well as an inexhaustible source of new therapeutic agents targeted actions. In order to find promising neuroactive compounds based on derivatives of vitamin B1 (thiamine) the effect of various of its derivatives on the key thiamine dependent reactions in the nerve cells had been studied. The studies were performed with both classical antagonists of thiamine and with new compounds that were synthesized on the basis of thiazole component of thiamine.

The ability of the above derivatives of thiamine to interact with cellular structures involved in the exchange or the functioning of thiamine was studied in different model systems: partially purified proteins, subcellular structures, isolated nerve terminals (synaptosomes), the cell culture. In these studies, attention was paid to such parameters as the absorption and binding of thiamine with synaptosomes, thiamine binding and thiamine triphosphatase activity of thiamine binding protein of synaptosomal plasma membranes, the activity of thiaminekinase (EC 2.7.6.2) - an enzyme that is responsible for the synthesis of thiamine diphosphate (ThDP), activity of ThDP-dependent enzymes, in particular – pyruvate dehydrogenase complex (PDC). Comparison of kinetic parameters of inhibition of processes thiamine metabolism in the nerve cells by the antagonists of thiamine (amprolium, oxythiamine, pirythiamine) and action of these derivatives on the survival of neuronal cells show that the critical links, inhibition of activity which initiates cell death are thiamine binding protein of plasma membrane and thiamine kinase.

Taking into account modulating noncoenzymic action of thiamine phosphates on the activity of pyruvate dehydrogenase complex and, consequently, on the synthesis of acetyl-CoA and acetyl choline that has been shown previously [1], the effect of thiamine derivatives on the incorporation of the 14C from labeled pyruvate into AX was also studied. A similar effect of thiamine and its antagonist – oxythiamine on the activity of PDC and the synthesis of acetyl choline from pyruvate has been shown in experiments with synaptosomes isolated from the brains of normal and B1-deficient rats, which confirms noncoensymic mechanism of thiamine action on the above processes.

The results of these studies indicate that the most promising as effectors of thiamine dependent processes are derivatives of thiamine, which contain thiazole cycle with unsubstituted hydroxyethyl radical similar to that which is present in the molecule of thiamine, are able to penetrate through the plasma membrane, and to be phosphorylated with cytosolic thiaminekinase or interact with it, influencing on exchange of intracellular pool of thiamine phosphates. Study of pharmacological activity of these compounds or their homologues may lead to the creation of new effective drugs for treatment or prevention of neurodegenerative diseases.

Reference:

1. *Yu.M. Parkhomenko, I.Yu. Chernysh, T. Ya. Churilova, A.G. Chalmuradov* // Influence of thiamine phosphates on the activity of regulatory enzymes of pyruvate dehydrogenase complex. - Ukr. Biochem. J., 1987, 59, № 6, p. 49-54

ЗМІНА АКТИВНОСТІ ФОСФОЛІПАЗ С ТА D У ВІДПОВІДЬ НА ДІЮ ІНДУКТОРІВ РЕЗИСТЕНТНОСТІ РОСЛИН

[1]Покотило І.В., [1]Кравець В.С., [2]Мартінец Я.

[1]Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України, Київ,Україна
e-mail: pokotylo@ukr.net
[2]Інститут експериментальної ботаніки АН Чеської Республіки, Прага, Чеська Республіка

Механізми внутрішньоклітинної трансдукції сигналів, що залучають продукти гідролізу мембранних фосфоліпідів за участю фосфоліпаз у якості вторинних месенджерів, на сьогодні постають одними з головних чинників регуляції метаболізму клітин рослин як за фізіологічних умов росту та розвитку, так і за умов дії стресових умов середовища. В той же час, біотичний стрес зумовлений дією патогенних мікроорганізмів постає одним з ключових факторів втрат врожайності і зумовлює необхідність активного впровадження методів застосування штучних та природних індукторів резистентності рослин та необхідність вивчення молекулярних механізмів їх внутрішньоклітинної дії.

Полярній фосфоліпід фосфатидилхолін відомий у якості основного компоненту біологічних мембран та здатен виступати у ролі субстрату для фосфоліпаз С та D, що забезпечують продукцію діацилгліцеролу та фосфатидної кислоти у якості молекул залучених у внутрішньоклітинний сигналінг. За допомогою використання флуоресцентно-міченого фосфатидилхоліну було встановлено, що активність продукції вторинних посередників діацилгліцеролу та фосфатидної кислоти за умов дії пептиду flg22 у суспензійній культурі клітин Арабідопсису швидко зростає *in situ*. Синтезований 22-амінокислотний пептид flg22 відтворює N-кінцеву амінокислотну послідовність природного білку джгутиків бактерій флагеліну та відомий у якості рецептор-залежного індуктора захисних реакцій метаболізму рослин в умовах дії патогенного ураження.

Внутрішньоклітинна дія фітогормону саліцилової кислоти у рослин здатна ініціювати розвиток системної набутої резистентності за умов патогенного ураження та забезпечувати активацію захисних PR генів та накопичення бактерицидних метаболітів. Було з'ясовано, що продукція фосфатидної кислоти внаслідок гідролізу C^{14} радіо-міченого фосфатидилхоліну за участю фосфоліпази Д зростала у суспензійній культурі клітин тютюну BY2 за умов дії S-метил ефіру бензо(1,2,3)тіадіазолу-7-карбатіонної кислоти, що є штучним функціональним аналогом саліцилової кислоти. Натомість продукція діацилгліцеролу за участю фосфатидилхолін-залежних фосфоліпаз С, ферментів, що залучені до регуляції активності протеїнкінази С ссавців, але які лише нещодавно були ідентифіковані у рослин, була зниженою в даних умовах.

Отримані дані можуть свідчити про залучення фосфоліпаз D, а також фосфатидилхолін-залежних фосфоліпаз С, нового компонента рослинного фосфоліпазного сигналізування, та вторинних месенджерів продукцію яких вони забезпечують, до сигналінгу на ранніх етапах дії біотичного стресу та у регуляції клітинних захисних механізмів спрямованих на захист проти дії патогенів.

Робота виконана за підтримки гранту Міжнародного Фонду Вишеград, www.visegradfund.org

PLANT PHOSPHOLIPASE C AND D ACTIVITY CHANGES IN RESPONSE TO RESISTANCE INDUCERS TREATMENT

[1]Pokotylo I.V., [1]Kravets V.S., [2]Martinec J.

[1]Institute of bioorganic chemistry and petroleum chemistry NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: pokotylo_i@ukr.net
[2]Institute of experimental botany AS of Czech Republic, Prague, Czech Republick

Intracellular signal transduction mechanisms that involve products of membrane phospholipids hydrolysis by phoshpolipases in the capacity of second messengers are today appear as one of the most important factors of cell metabolism regulation under physiological conditions of growth and development as well as under environmental stress conditions. At the same time, biotic stresses caused by pathogenic microorganisms influence is now recognized as one of the key causes of yield loss and stipulate the need for dynamic development of methods for employment of natural and artificial inducers of plant resistance and necessity for study of molecular mechanisms of their intracellular action.

Polar phospholipid phosphatidylcholine is known as a major component of biological membranes and capable to play the role of substrate for phospholipases C and D that provide production of diacylglycerol and phosphatidic acid as a molecules implicated to intracellular signaling.

With the help of fluorescently-labeled phosphatidylcholine substrate utilization it was found that second messenger diacylglycerol and phosphatidic acid production activity was quickly rising *in situ* in suspension cell culture of Arabidopsis under oligopeptide flg22 treatment. Synthesized 22-aminoacid oligopeptide flg22 represents amino acid sequence of N-terminal part of native flagellum protein and is known as a receptor-dependent inducer of defence reactions of metabolism under pathogenic lesion.

Salicylic acid phytohormone systemic is known in a capacity systemic acquired resistance inducer under biotic stress conditions that provide accumulation of bactericidal metabolites and activation of defense PR genes. It was found that production of phosphatidic acid as a result of C^{14} radio-labeled phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D was elevated in tobacco suspension cell culture BY2 under treatment with benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester, substance that function as a analogue of defence salicylic acid phytohormone. At the same time production of diacylglycerol by novel phosphatidylcholine-dependent phospholipases C, recently identified plant enzymes known to be involved to regulation of protein kinase C activity in animals, was reduced in the same conditions.

Our findings may indicate implication of phosphpolipases D, as well as phosphatidylcholine-dependent phospholipases C, a novel component of plant phospholipase signaling, and produced second messengers, to signaling at early stages of biotic stress action and to regulation of cell defence mechanisms aimed at defence against pathogene influence.

Study was supported by International Visegrad Fund scholarship, www.visegradfund.org

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ СИГНАЛИНГА ЦИТОКИНИНОВ

Романов Г.А.

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия
e-mail: gar@ippras.ru

Первым растением, у которого были идентифицированы белки-рецепторы цитокининов и кодирующие их гены, был арабидопсис. 10 лет тому назад, в 2001 г. сразу две группы японских исследователей сообщили о том, что гибридная сенсорная гистидинкиназа CRE1/AHK4, высокомолекулярный мультидоменный белок с гидрофобными трансмембранными участками, является рецептором цитокининов, передающим гормональный сигнал на гены первичного ответа. Вскоре после этого было установлено, что два других гомологичных гена арабидопсиса, *AHK2* и *AHK3*, также кодируют близкие по свойствам рецепторы цитокининов [1]. Обнаруженная множественность рецепторов цитокининов характерна не только для арабидопсиса, но для других видов растений (кукурузы, риса, люцерны и др.) и ставит вопрос о том, в чем биологический смысл такой организации аппарата рецепции этих фитогормонов.

Исследования рецепторов цитокининов арабидопсиса проводятся по разным направлениям. В нашей работе мы уделили особое внимание изучению основных свойств рецепторов цитокининов, важных для узнавания гормона. Для этого нами была разработана удобная высокопроизводительная система анализа лиганд-связывающих свойств индивидуальных рецепторов, клонированных в специальных штаммах *E. coli* [2,3]. С помощью данного метода нам удалось, в частности, подтвердить функциональную роль CHASE-домена белка в узнавании гормона: отделенный CHASE-домен связывал цитокинин почти так же активно, как и нативный белок-рецептор [4].

Лиганд-связывающие свойства были изучены для всех трех индивидуальных рецепторов цитокининов. Оказалось, что рецепторы CRE1/AHK4 и AHK2 обладают сходной лигандной специфичностью и отличаются в этом отношении от рецептора AHK3. Все три рецептора связывали распространенный цитокинин *транс*-зеатин с высоким сродством ($K_д$ на уровне 1-5 нМ), но различались по относительному сродству к изопентениладенину (iP) и дигидрозеатину (DHZ). В отличие от CRE1/AHK4 и AHK2, AHK3 связывал iP относительно слабо, зато имел повышенное сродство к DHZ. Рибозидные производные цитокининов имели меньшее сродство к рецепторам по сравнению с основаниями, а *O*-глюкозидные производные и немодифицированный аденин были практически неактивны. Интересно отметить, что сродство рецепторов к ароматическому цитокинину 6-бензиладенину относительно невысоко, зато синтетический цитокинин, производное фенилмочевины тидиазурон связывался с высоким сродством с тем же сайтом рецептора, что и цитокинины-производные аденина [5].

Сопоставление данных о лигандной специфичности рецепторов цитокининов с данными о роли индивидуальных рецепторов в развитии гормон-зависимых процессов в растении привело нас к выводу о неслучайном характере выявленных различий. Известно, что рецептор AHK3 экспрессируется в основном в побеге (листьях) и отвечает за процессы, связанные с развитием побега (де-этиоляция, рост и старение листьев, развитие хлоропластов и т.д.), тогда как рецептор CRE1/AHK4 экспрессируется в основном в корне и участвует в регуляции роста этого органа. Важно отметить, что корни продуцируют основную массу цитокининов, и эти цитокинины, представленные главным образом *транс*-зеатином и его рибозидом, поступают из корня по ксилеме в надземную часть растения. В то же время в побеге образуются свои цитокинины, транспортируемые по флоэме, однако флоэмные цитокинины представлены в основном iP и его производными. Исходя из установленных лиганд-связывающих свойств рецепторов, была предложена модель, согласно которой особенности «листового» рецептора AHK3 позволяют ему реагировать в первую очередь на цитокинины зеатинового типа, идущие из корня, и слабо отвечать на цитокинины iP-типа, синтезируемые в побеге. Тем самым при участии цитокининов осуществляется дальнедистанционная сигнальная связь корень-побег, способствующая лучшей координации функций подземных и надземных органов в интактном растении [1,5]. Недавно полученные с нашим участием данные о свойствах цитокининовых рецепторов кукурузы также находятся в согласии с предложенной моделью и свидетельствуют о том, что множественность рецепторов цитокининов и особенности их лигандной специфичности могли быть развиты в ходе эволюции именно для повышения качества сигнальной коммуникации между корнем и побегом в целостном растении.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантов РФФИ (проекты № 07-04-91211 и 11-04-00614).

Литература:

1. *Г.А. Романов* // Как цитокинины действуют на клетку – Физиол. растений, 2009, т. 56, №2, с. 295-319
2. *G.A. Romanov, L. Spichal, S.N. Lomin, M. Strnad, T. Schmulling* // Live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein – Anal. Biochem., 2005, v. 347, p. 129-134
3. *G.A. Romanov, S.N. Lomin* // Hormone-binding assay using living bacteria expressing eukaryotic receptors – Meth. Mol. Biol. (Humana Press), 2009, v. 495, p.111-120
4. *A. Heyl, K. Wulfetange, B. Pils, N. Nielsen, G.A. Romanov, T. Schmulling* // Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain – BMC Evol. Biol., 2007, v. 7, p. 62
5. *G.A. Romanov, S.N. Lomin, T. Schmulling* // Biochemical characteristics and ligand-binding properties of Arabidopsis cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay – J. Exp. Bot., 2006, v. 57, p. 4051-8

MOLECULAR BASIS OF CYTOKININ SIGNALING

Romanov G.A.

Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia.
e-mail gar@ippras.ru

Arabidopsis was the first plant where cytokinin receptors and their encoding genes were identified. 10 years ago, in 2001, just two groups of Japanese researchers reported that the hybrid sensor histidine kinase CRE1/AHK4, high molecular weight multidomain protein with a hydrophobic transmembrane regions, is a receptor of cytokinin, transmitting the hormonal signal to the primary response genes. Shortly thereafter, it was found that two other homologous Arabidopsis genes, AHK2 and AHK3, also encode closely resembling cytokinin receptors [1]. The observed multiplicity of cytokinin receptors is not unique to Arabidopsis, but also for other plant species (maize, rice, alfalfa, etc.) and raises the question about the biological significance of such an organization of perception apparatus for these phytohormones.

The research of Arabidopsis cytokinin receptors expanded in different directions. In our study we paid special attention to studying the basic properties of receptors which are important for recognition of the hormone. For this purpose, we developed a convenient high-performance analysis of the ligand-binding properties of individual receptors, cloned in a special strain of *E. coli* [2,3]. Using this method we were able, in particular, to confirm the functional role of the protein CHASE-domain in the recognition of the hormone: the isolated CHASE-domain bound cytokinin almost as active as the native protein-receptor [4].

Ligand-binding properties were studied for all three individual cytokinin receptors. It was found that receptors CRE1/AHK4 and AHK2 have a similar ligand specificity and differ in this respect from the receptor AHK3. All three receptors bind common cytokinin *trans*-zeatin with high affinity (K_D at the level of 1-5 nM), but differed in their relative affinity for isopentenyladenine (iP) and dihydrozeatin (DHZ). Unlike CRE1/AHK4 and AHK2, AHK3 bound iP relatively weakly, but had a high affinity for the DHZ. Riboside derivatives of cytokinins had less affinity for the receptor compared to bases, and the *O*-glucoside derivatives and unmodified adenine were virtually inactive. Interestingly, the affinity of receptors for aromatic cytokinin 6-benzyladenine is relatively low, but the synthetic cytokinin, phenylurea derivative thidiazuron interacts with high affinity with the same receptor site as cytokinins-adenine derivatives [5].

Comparison of the ligand specificity of cytokinin receptors with the data on the role of individual receptors in the development of hormone-dependent processes in plants led us to the conclusion on the nonrandom nature of the observed differences. It is known that the receptor AHK3 is expressed mainly in the shoot (leaves) and is responsible for the processes associated with the development of the shoot (de-etiolation, growth and senescence of leaves, chloroplast development, etc.), whereas the receptor CRE1/AHK4 is expressed mainly in the root and is involved in growth regulation of this organ. It is important to note that roots produce the bulk of cytokinins and these cytokinins are represented primarily by *trans*-zeatin and its riboside transported from the root along the xylem to the aboveground part of the plant. At the same time another cytokinin pool is produced in the shoot and transported via the phloem, but the phloem cytokinins are mainly iP and its derivatives. Proceeding from the ligand-binding properties of receptors, a model was proposed according to which the characteristics of the "leaf" receptor AHK3 allow him to respond primarily to zeatin-type cytokinins coming from the root, and weakly respond to iP-type cytokinins synthesized in the shoot. Thus the long-distance signaling between root and shoot is realized with the participation of cytokinins and helps better coordinate the functioning of underground and aboveground organs in intact plant [1,5]. Results of recent joint studies with our participation on the properties of maize cytokinin receptors are also in agreement with the proposed model and suggest that the multiplicity of cytokinin receptors and characteristics of their ligand specificity might be developed in the course of evolution to improve the quality of signal communication between roots and shoots in a holistic plant.

This work was accomplished with the financial support by RFBR grants (projects N07-04-91211 and 11-04-00614) and Program of Presidium RAS «Molecular and Cell Biology»

References:

1. *G.A. Romanov* // How do cytokinins affect the cell? – Russian J. Plant Physiol., 2009, v. 56, N2, p. 268-290
2. *G.A. Romanov, L. Spichal, S.N. Lomin, M. Strnad, T. Schmulling* // Live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein – Anal. Biochem., 2005, v. 347, p. 129-134
3. *G.A. Romanov, S.N. Lomin* // Hormone-binding assay using living bacteria expressing eukaryotic receptors – Meth. Mol. Biol. (Humana Press), 2009, v. 495, p.111-120
4. *A. Heyl, K. Wulfetange, B. Pils, N. Nielsen, G.A. Romanov, T. Schmulling* // Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain – BMC Evol. Biol., 2007, v. 7, p. 62
5. *G.A. Romanov, S.N. Lomin, T. Schmulling* // Biochemical characteristics and ligand-binding properties of Arabidopsis cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay – J. Exp. Bot., 2006, v. 57, p. 4051-8

МОЛЕКУЛЯРНІ ШАПЕРОНИ ЯК УНІВЕРСАЛЬНІ РЕГУЛЯТОРИ СТРЕС-ІНДУКОВАНОГО СИГНАЛІНГУ В КАРДІОМІОЦИТАХ

Сидорик Л.Л.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна
e-mail: sidorik@imbg.org.ua

Фізіологічний стрес (від ішемії до генних мутацій) продукує патологічний стан, в якому порушення структури білків має загальний характер. Здатність клітини визначати шлях росту, поділу, диференціації або загибелі залежить від єкстраклітинних сигналів і властивості відповідного розпізнавання і компетентної відповіді на ці сигнали. білки теплового шоку або молекулярні шаперони (HSPs) взаємодіють з багатьма ключовими компонентами сигнальних шляхів, які регулюють ріст та розвиток, виживання та клітинну загибель. Молекулярні взаємодії між HSPs , їх ко-шаперонами і різними сигнальними молекулами регулюють проліферацію та розвиток шляхом запобігання або підсилення клітинного росту та клітинної смерті, тому що HSPs здатні швидко змінювати їх експресію та.або клітинну локалізацію у відповідь на будь-який стрес або хворобу. Вірогідно, що HSPs ко-еволюціонували як інтегральний компонент шляхів сигнальної трансдукції, де вони функціонують на рівнях дозрівання, активації та інактивації сигнальних молекул.

Кардіоміоцити відповідають на стрес через індукцію програми клітинної загибелі апоптоз чи некроз, в залежності від природи залучених регуляторних факторів (таких HSPs, сімейство білків Bcl-2, ростові фактори,

кальцій та оксиданти). Запрограмована клітинна загибель кардіоміоцитів відрізняється як на морфологічному, так і на біохімічному рівні від інших типів клітин. Клітинна загибель проявляється в кардіоміоцитах через зменшення їх кількості, що є основним патогенетичним фактором в розвитку серцевої недостатності.

Ми досліджували особливості експресії і клітинної локалізації основних цитоплазматичних (Hsp70, Hsp90) і мітохондріального (Hsp60) шаперонів при гострій фазі (міокардит) та хронічній фазі (дилятаційна кардіоміопатія, ДКМ) прогресії серцевої недостатності. Особливості експресії шаперонів в динаміці прогресії серцевої недостатності досліджували на розроблених в нашій лабораторії унікальних експериментальних моделях індукованого міокардиту та індукованого ДКМ-подібного ураження міокарду мишей.

За допомогою Вестерн-блот-аналіза і ЗТ-ПЛР аналіза нами виявлені суттєві зміни експресії молекулярних шаперонів Hsp70 і Hsp60 в ДКМ-ураженому міокарді у порівнянні із ішемічним та нормальним міокардом.

Вперше виявлені зміни клітинної локалізації шаперонів Hsp60, Hsp90і формування *in vivo* комплексів між шапероніном Hsp60 і проапоптичним білком Bax, з одного боку, та шапероніном Hsp60 і p70S6 кіназою, з другого боку, в ДКМ-ураженому міокарді дозволили зробити припущення про порушення регуляторних функцій Hsp60 у стрес-індукованого сигналінгу в кардіоміоцитах при прогресії серцевої недостатності.

Аналіз літературних даних про потенційну анти-апоптичну функцію в кардіоміоцитах цитозольних Hsp60 і Hsp70, і важлива роль Hsp90 в регуляції убіквітин-протеасомної деградації білків, а також отримані нами дані дозволили висунути гіпотезу про залучення молекулярних шаперонів як до виникнення, так і до прогресії серцевої недостатності, з патологічними автоімунними процесами. Особливу увагу привертає шаперонін Hsp60 завдяки нещодавно виявленому про-запальному потенціалу як Hsp60, так і анти-Hsp60 автоантитіл, які детектують як в крові хворих, так і здорових індивідів.

Перспективи детального дослідження регуляторної ролі молекулярних шаперонів в стрес-індукованому сигналінгу кардіоміоцитів і нова терапевтична стратегія лікування серцевої недостатності, яку вважають серцевою епідемією XXI сторіччя, є предметом наукової дискусії.

MOLECULAR CHAPERONS AS UNIVERSAL REGULATORS OF STRESS-INDUCED SIGNALING IN CARDIOMYOCYTES

Sidorik L.L.

Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: sidorik@imbg.org.ua

Physiological stresses ranging from myocardial ischemia to genetic mutations produced disease state in which protein damage and misfolded protein structures are common denominator. The ability of a cell to know whether to grow, divide, differentiate or die depends upon extracellular signals and the ability to properly recognize and respond to these signals. Heat shock proteins (HSP) interact with multiple key components of signaling pathways that regulate growth and development, survival and cell death. The molecular interactions between HSPs , their co-chaperons and various signaling proteins can regulate proliferation and development by preventing or enhancing cell growth and cell death as the HSPs change their expression and cellular localization in response to environmental stress or disease. HSPs have co-evolved as integral component of signal transduction network, in which they can function in the maturation, activation and inactivation of signaling molecules.

Cardiomyocytes respond to stress by induction of cell death program – apoptosis or necrosis depending from subset of regulatory proteins involved (such as HSPs, Bcl-2 family of proteins, growth factors, calcium and oxidants). The programmed cell death in cardiomyocytes differ at morphological and biochemical levels from other types of cell. Cell death manifested in cardiomyocytes loss which may be a major pathogenic factor in heart failure development.

We studied the expression and cellular localization of abundant cytoplasmic (Hsp70, Hsp90) and mitochondrial (Hsp60) chaperons at the acute phase (myocarditis) and chronic phase (DCM) of heart failure. The experimental mouse models of DCM-like and autoimmune myocarditis-like pathologies developed in our Laboratory allow to study the peculiarities of HSPs expression at heart failure progression in dynamics .

The significant changes of Hsp70 and Hsp60 expression levels have been observed by Western-blot and RT-PCR analysis in cardiomyocytes from DCM affected heart in comparison with myocarditis-affected and normal ones. Besides, we revealed a cellular re-localization for Hsp60, Hsp90 and in vivo Hsp60-Bax and Hsp60-p70S6 kinase complexes formation in DCM-affected hearts which could be linked with altered regulation of stress-induced signal pathways of cardiomyocytes at heart failure development.

The results obtained taken together with recently published data concerning antiapoptotic role of cytosolic cardiac Hsp60 and Hsp70 and the role of Hsp90 in regulation of ubiquitin-proteasome degradation of proteins allow us to proposed a working hypothesis about possible involvement of HSPs at heart failure origin and progression. Molecular chaperon (chaperonin) Hsp60 is a special interest due to recently observed pro-inflammation potential of Hsp60 and anti-Hsp60 autoantibodies which have been detected in circulation of diseased and healthy persons as well.

The future perspectives of the possible HSPs regulatory role study in stress-induced cardiomyocytes signaling and new therapeutic strategies based on such researches will be discussed.

АНТАГОНІСТИ pH-КЕРОВАНИХ ІОННИХ КАНАЛІВ КЛАСУ 3-АМІДИНОКУМАРИНІВ

[1]Сукач В.А., [2]Максимюк О.П., [3]Ковальський Д.Б., [2]Бута А.З., [1]Шоба В.М., [1]Вовк М.В., [2]Кришталь О.О.

[1]Інститут органічної хімії НАН України, Київ, Україна
e-mail: vsukach@bigmir.net
[2]Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, Україна
[3]Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна

pH-керовані іонні канали (ASICs, Acid Sensing Ion Channels) є так званими «рецепторами протонів», які активуються при зниженні pH середовища. Вони експресуються у багатьох типах клітин, але переважним чином у нейронах ЦНС та ПНС залежно від підтипу [1].

Відомо, що зниження рівня pH у тканині (ацидоз) є наслідком багатьох патологічних процесів, таких як розвиток ішемії, запалення, артритів, гематом, злоякісних пухлин. Встановлено, що гострі та хронічні больові відчуття при таких захворюваннях є результатом прямого збудження закінчень первинних сенсорних нейронів завдяки активації ASIC3 в умовах ацидозу. Тому останнім часом pH-керовані іонні канали третього підтипу стали важливою молекулярною мішенню для розробки принципово нових анестетиків спрямованої дії.

Окрім того, було доведено, що активація ASIC1a внаслідок ішемічного ацидозу є головною причиною ураження нейронів головного мозку. При цьому нейротоксичний ефект досягається за рахунок підвищення концентрації іонів кальцію, які здатні проникати через pH-керований канал даного підтипу. Таким чином, контроль над функціонуванням ASIC в центральній нервовій системі відкриває нові перспективи для лікування патологічних наслідків ішемічного інсульту [2].

Нещодавно були одержані рентгеноструктурні дані про будову ASIC1a у десенситизованому стані [3]. Авторами даного дослідження був запропонований ймовірний механізм відкриття каналу під дією надлишкової концентрації протонів. Відповідно до наведеної схеми, ключову роль у сприйнятті зниження рівня pH рецептором відіграє пептидний сайт (pH-сенсор), насичений залишками аспарагінової та глутамінової кислот, протонування яких приводить до віддалених конформаційних змін та відкриття пори каналу.

Використовуючи методи комп'ютерного моделювання нами створені раціональні засади для дизайну молекул антагоністів pH-керованих іонних каналів, спрямованих на ефективне зв'язування в pH-сенсорі рецептора та блокування його чутливості до підвищення концентрації протонів. За допомогою молекулярного докінгу були окреслені структурні вимоги до лігандів вказаного сайту. За результатами проведених розрахунків, нами здійснено синтез ряду нових похідних 3-амідинокумарину, серед яких найбільш активною виявилась сполука KMS5. Встановлено, що блокувальний ефект KMS5 є оборотним та залежним від pH активації ASIC1a. Зокрема при активаційному pH рівному 6.7 (найбільш характерне значення в умовах ацидозу in vivo) повне пригнічення струмів настає вже при концентрації 0.1 мкмоль/л, тоді як активація рецептора сильно кислим середовищем з pH 5.0 вимагає значно вищої концентрації – більш ніж 50 мкмоль/л. Побудовані активаційні криві вказують на дію антагоніста конкурентного типу по відношенню до нативних лігандів - протонів, що передбачає запропонована нами теоретична модель взаємодії молекули 3-амідинокумарину KMS5 з рецептором ASIC1a. Таким чином, знайдені нами антагоністи pH-керованих іонних каналів нового структурного типу володіють високою активністю та унікальним механізмом дії, що полягає в конкурентному блокуванні pH-сенсора рецептора і можуть бути перспективними сполуками для розробки лікарських засобів.

Література:

1. *O. Krishtal* "The ASICs: Signaling molecules? Modulators?" TRENDS in Neurosciences 2003, Vol.26, N. 9, p. 477-483.
2. *Z.-G. Xiong, G. Pignataro, M. Li, S.-Y. Chang, R. P.* Simon "Acid-sensing ion channels (ASICs) as pharmacological targets for neurodegenerative diseases" Current Opinion in Pharmacology 2007, Vol. 7, p. 1-8.
3. *J. Jasti, H. Furukawa, E. B. Gonzales, E. Gouaux* "Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH" Nature 2007, Vol. 449, p. 316-323.

ANTAGONISTS OF ACID SENSING ION CHANNELS FROM THE FAMILY OF 3-AMIDINOCOUMARINES

[1]Sukach V.A., [2]Maximyuk O.P., [3]Kovalskyy D.B., [2]Buta A.Z., [1]Shoba V.M., [1]Vovk M.V., [2]Krishtal O.O.

[1]Institute of Organic Chemistry NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: vsukach@bigmir.net
[2]Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
[3]Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Acid sensing ion channels (ASICs) are so-called "proton receptors", which are activated at low pH. They are expressed in many cell types, but mostly in neurons of CNS and PNS depending on the subtype [1].

It is known that pH lowering in the tissues (acidosis) is an attribute of many pathological processes, such as development of ischemia, inflammation, arthritis, hematoma, malignant tumors. It was stated that acute and chronic pain of such diseases are result of direct excitation of primary sensory neurons through activation of ASIC3 in acidosis conditions. Therefore, acid sensing ion channels of third subtype have become an important molecular target for developing an entirely new anesthetics directly acting on pain root.

In addition, it was shown that activation of ASIC1a during ischemic acidosis causes a major injury to brain neurons. This neurotoxic effect is achieved by raising the intracellular concentration of calcium ions that can penetrate through the acid sensing channel subtype 1a. Thus, control over acid sensing ion channels functioning in the central nervous system opens up new perspectives for the treatment of pathological consequences of ischemic stroke [2].

Recently, X-ray data were obtained on the structure of ASIC1a in desensitisized state [3]. The authors of this study proposed possible mechanism of channel gating by excessive concentration of protons. According to the introduced scheme, the key role in the perception of lower pH level is attributed to receptor site called pH-sensor. The last is enriched with aspartic and glutamic acid residues, protonation of which leads to remote conformational changes and pore opening of the channel.

Using computer modeling methods we have created the basis for rational design of antagonist molecules for acid sensing ion channels aimed at the effective binding in the pH-sensor and blocking its sensitivity to increasing concentrations of protons. Using molecular docking approaches we defined structural requirements for small molecule to be good ligands for this site. Based on the results of calculations, we have accomplished the synthesis a series of new derivatives of 3-amidinocoumarin. The most active compound appeared KMS5. It was established that the blocking effect of KMS5 is reversible and depends on pH level of ASIC1a activation. Particularly at activating pH equal to 6.7 (the most abundant acidosis value *in vivo*) full inhibition of currents occurs even at concentrations of as low as 0.1 μmol/l, whereas receptor activation by more dramatic pH drop to 5.0 requires much higher concentrations – over 50 μmol/l. Obtained activation curves indicate that competitive antagonist is in action against native ligands - protons, as our theoretical model predicts for the 3-amidinocoumarin KMS5 interaction with ASIC1a. Thus we found a new structural motif of ASIC antagonists, possessing high activity and unique competitive blocking mechanism of action, making such antagonists promising candidates for drug development.

References:

1. *O. Krishtal* "The ASICs: Signaling molecules? Modulators?" TRENDS in Neurosciences 2003, Vol.26, N. 9, p. 477-483.
2. *Z.-G. Xiong, G. Pignataro, M. Li, S.-Y. Chang, R. P. Simon* "Acid-sensing ion channels (ASICs) as pharmacological targets for neurodegenerative diseases" Current Opinion in Pharmacology 2007, Vol. 7, p. 1-8.
3. *J. Jasti, H. Furukawa, E. B. Gonzales, E. Gouaux* "Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH" Nature 2007, Vol. 449, p. 316-323.

РОЛЬ ЛІПІДНОЇ СИГНАЛІЗАЦІЇ І РЕГУЛЯЦІЇ БАЛАНСУ АНТИОКСИДАНТНИХ СИСТЕМ У РЕАКЦІЯХ РОСЛИН СОЇ НА ДІЮ МЕДІАТОРІВ БІОТИЧНОГО СТРЕСУ

Яковенко О.М., Калачова Т.А., Кретинін С.В., Кравець В.С.

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: yon@bpci.kiev.ua

Соя (*Glycine max*) постійно зазнає впливу широкого спектру патогенів некротрофного та біотрофного типів живлення. Виявлення шляхів зниження втрат та підвищення якості урожаю сої потребує вивчення молекулярних механізмів регуляції вмісту біологічно активних речовин та їх зв'язку із розвитком захисних реакцій на ураження патогенами. На сьогодні особливий інтерес викликають сигнальні каскади, задіяні в регуляції метаболічної відповіді рослин на дію стресових агентів біотичної природи, зокрема, еліситорів патогенезу і медіаторів системної набутої стійкості: саліцилової і жасмонової кислот. Універсальним вторинним месенджером ліпідної природи є фосфатидна кислота, що утворюється зі структурних фосфоліпідів внаслідок активації фосфоліпази D, а також з діацилгліцеролу за допомогою діацилгліцеролкіназ. Проведені нами дослідження виявили індуковане екзогенною саліциловою кислотою підвищення вмісту фосфатидної кислоти у проростках сої, що свідчить про активацію ферментів ліпідного метаболізму Для візуалізації активації фосфоліпази D в середовище інкубації тканин вводили 1-бутанол, включення якого в реакцію гідролізу фосфоліпідів призводить до утворення специфічного продукту – фосфатидилбутанолу. За таких умов 30 та 60 хвилинний вплив саліцилової кислоти індукував підвищення вмісту фосфатидилбутанолу більш ніж вдвічі, що свідчить про включення фосфоліпази D в каскад реакцій, активованих еліситором.

Існують свідчення про антагоністичний характер взаємодії сигнальних шляхів саліцилової і жасмонової кислот. Водночас, за низьких екзогенних концентрацій цих фітогормонів зафіксовано ефект синергзму, необхідний, ймовірно, для швидкої активації захисних систем рослини за перших ознак ураження. Дійсно, вплив обох медіаторів імунних реакцій викликав зміни балансу ферментних антиоксидантних систем рослин сої та накопичення в тканинах ендогенного пероксиду, що було максимальним за спільної дії саліцилової і жасмонової кислот. Виявлена за дії досліджених еліситорів інтенсифікація процесів перекисного окислення ліпідів супроводжувалася зниженням загальної відновлювальної активності фенольних антиоксидантів. Зафіксоване в ході роботи підвищення активності супероксиддисмутази необхідне для детоксифікації супероксидних радикалів, продукованих НАДФН-оксидазою у відповідь на дію медіаторів біотичного стресу. В свою чергу, зниження активності каталази унеможливлює остаточну деградацію активних форм кисню та забезпечує підтримання вмісту пероксиду на рівні, необхідному для забезпечення розвитку імунних реакцій рослинного організму. Таким чином, отримані нами дані свідчать про залучення ферментів ліпідного сигналінгу і тонкої регуляції систем генерації та детоксикації активних форм кисню в реакції клітин рослин за дії медіаторів біотичного стресу.

Дослідження виконані за підтримки Грантів НАН України 2.1.10.32-09; №8-10 і Державного фонду фундаментальних досліджень України №Ф29.4/019. Сортове насіння сої люб'язно надане Інститутом землеробства УААН.

ROLE OF LIPID SIGNALLING AND ANTIOXIDANT SYSTEMS BALANCE REGULATION IN SOYBEAN PLANT REACTION TO BIOTIC STRESS MEDIATORS

Iakovenko O. M., Kalachova T.A., Kretynin S. V., Kravets V. S.

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: yon@bpci.kiev.ua

Soybean plants (*Glycine max*) are being constantly exposed to a wide range of necrotrophic and biotrophic pathogens. Identification of ways to reduce losses and improve quality of soybean crop calls for a thorough study of molecular mechanisms of biologically active substances content regulation and their relationship to the defense responses development. Nowadays, exceptional research interest is dedicated to signaling cascades involved in metabolic responses regulation in plants under biotic stress agents influence, including elicitors, mediators of the pathogenesis and systemic acquired resistance - salicylic and jasmonic acid hormones. Phosphatidic acid is a universal lipid second messenger formed from structural lipids by phospholipase D hydrolyzing activity as well as from diacylglycerol by diacylglycerolkinases. Significant increase in phosphatidic acid content in SA-treated soybean seedlings represents the evidence of lipid metabolism enzymes activation. The addition of 1-butanol to the incubation medium led to phosphatidylbutanol accumulation as a result of phospholipase D activity under SA treatment. Such conditions facilitated more than two fold increase in phosphatydylbutanol content after 30 and 60 minutes of salicylic acid action suggesting inclusion of phospholipase D to the elicitor-induced reaction cascade.

Salicylic and jasmonic acid generally show antagonistic effects, but at low exogenous concentrations synergy was observed. It could be essential as a first step of rapid activation of defense mechanisms under pathogen action. Indeed, antioxidant system balance changes were registered in soybean plants under the influence of immune reactions mediators and correlated with endogenous peroxide accumulation in tissues with maximum effect observed under the joint phytohormone action. Intensification of lipid peroxidation detected for the studied elicitors was accompanied by decrease in total reduction activity of phenolic antioxidant compounds. Displayed superoxide dismutase activity increase is known to be necessary for detoxification of superoxide radicals produced by membrane NADPH oxidase action in response to biotic stress mediators. At the same time, the decreased catalase activity prevents terminal degradation of reactive oxygen species and maintains peroxide content at the level required for protective responces development in the plant organism. Thereby our findings suggest the involvement of lipid signaling and reactive oxygen species generation and detoxification enzymes to plant defense reactions under biotic stress mediators application.

Research was supported by grants NAS of Ukraine 2.1.10.32-09; № 8-10 and the State Fund for Fundamental Research of Ukraine № F29.4/019. Soybean seeds were kindly provided by the Institute of Agriculture NAS of Ukraine.

Фундаментальные и прикладные аспекты применения биологически активных веществ:
сверхнизкие концентрации, модуляция биоактивности физическими факторами

Fundamental and Applied Problems of Application of Bioactive Substances:
Extremely Low Concentration, Modulation of Bioactivity by physical Factors

Спонсор Конференции

BIO-RAD

BIO-RAD Laboratories

Обладнання і реагенти для дослідницьких, медичних та промислових лабораторій

Компанія BIO-RAD (США) є найбільшим світовим виробником лабораторного та аналітичного обладнання. На сьогодні BIO-RAD представляє широку гамму обладнання для дослідницьких та промислових лабораторій:

- **ПЛР-ампліфікатори CFX96 Real Time**
- **Обладнання та реагенти для геном них та протеомних досліджень**
- **Обладнання для рідинної хроматографії**
- **Обладнання, реагенти і витратні матеріали для електрофорезу та блоттінгу**
- **Системи анализу зображення. Документуючі системи. Програмне забеспечення**

За додатковою інформацією щодо технічних можливостей та вартості продукції компанії BIO-RAD просимо Вас звертатися до регіонального представництва компанії в Україні за адресою:

Київ, 02160, проспект Возз'єднання 7а, оф. 315
Тел.: (050) 446-21-13, (050) 448-34-56
e-mail: office@bio-rad.com.ua
www.bio-rad.com

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ НА БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ КОМБИНИРОВАННОГО МАГНИТНОГОПОЛЯ

[1]Богатина Н.И., [2]Шейкина Н.В., [3]Кордюм Е.Л.

Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина, Харьков, Украина
e-mail: n_bogatina@rambler.ru
[2]Национальнный Фармацевтический университет, Харьков, Украина
[3]Институт Ботаники им. Н.Г. Холодного, Киев, Украина
e-mail: cellbio@ukr.net

Подробное изучение действия комбинированного магнитного поля на гравитропическую реакцию корней кресс-салата показало, что наблюдаемый в эксперименте эффект зависит от двух факторов. (Комбинированное магнитное поле – это постоянное магнитное поле и параллельное ему переменное магнитное поле). Эти факторы – это уровень магнитных шумов комбинированного магнитного поля и значение концентрации ионов кальция в воде, в которой предварительно производили проращивание корней кресс-салата.

Уровень магнитного шума комбинированного магнитного поля можно было изменять искусственно. Его контролировали в течение эксперимента. Предварительное проращивание корней кресс-салата производилось в водных растворах с изменяющейся концентрацией ионов кальция в воде. Начальное направление проращиваемых корней в земных условиях - параллельно силе тяжести Земли. Затем эти корни размещали горизонтально на пенопластовой подложке, обернутой в фильтровальную бумагу, смоченную водой. Концы корешков длиной 5 мм располагались в воздухе. Всю подложку с корнями помещали во влажную термостабилизипованную камеру (влажность – 100%, температура за время эксперимента изменялась не более, чем на 0.1^{o}). Вся конструкция помещалась в трехслойный пермаллоевый экран внутрь соленоида с двумя обмотками. Одна обмотка служит для создания искусственного постоянного магнитного поля, другая – для искусственного создания переменного магнитного поля и его шумов. Таким образом, начальное направление корешков параллельно Земле и перпендикулярно комбинированному магнитному полю.

Были получены следующие результаты. При частоте переменной составляющей комбинированного магнитного поля, равной циклотронной частоте для иона кальция в вакууме, наблюдали отрицательную гравитропическую реакцию корней кресс-салата. Показано, что наблюдаемый эффект нелинейно зависит от концентрации ионов кальция в растворе для проращивания. Существует оптимальная концентрация ионов кальция, при которой наблюдаемый эффект достигает максимального значения. При искусственном увеличении уровня магнитных шумов происходит уширение всех наблюдаемых максимумов.

Обсуждается модель, в которой ионы кальция являются первичной мишенью действия комбинированного магнитного поля.

EFFECT OF CALCIUM IONS CONCENTRATION ON THE BIOLOGICAL ACTION OF COMBINED MAGNETIC FIELD

[1]Bogatina N. I., [2]Sheykina N.V., [3]Kordyum E.L.

[1]B. Verkin Institute for Low Temperature Physics &Engineering of National academy of sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine
e-mail: n_bogatina@rambler.ru
[2]National University of Pharmacy, Kharkov, Ukraine
e-mail:sheykina@ukr.net
[3] N. Kholodny Institute of Botany of National academy of sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine,
e-mail: cellbio@ukr.net

The studying in details of combined magnetic field (CMF) action on the gravitropic reaction of cress roots showed that the effect observed in experiment depended on two factors (Combined magnetic field was the permanent magnetic field and parallel to it alternative magnetic field) These factors were the CMF magnetic noise level and calcium ions concentration in the water, in that the preliminary germination of cress roots was treated.

The magnetic noise level of CMF was changed artificially and was controlled during the experiment. Preliminary germination of cress roots was done in the solutions with different concentration s of calcium ions in the water. The cress roots were located on the horizontal place of phenoplast on the wet filter paper. The cress roots were in the air. The place with the cress roots was located in the wet chamber (the wetness was 100%). All the construction was located in the phenoplast camera with big walls. So the temperature in the camera didn't change more than 0.1 ^{o} during the experiment . So the roots were located parallel to the Earth and perpendicular to the combined magnetic field direction.

The following results were obtained .At the frequency of the alternative component tuned formally to the cyclotron frequency of calcium ions in vacuum we observed negative gravitropism of cress roots. It was shown that the effect depended nonlinear on the calcium ions concentration of the solution for germination. There was the optimum calcium ions concentration at which the effect achieved its maximum value. The spread of the effect was observed while the CMF magnetic noise level was increasing.

A model in which calcium ions were the initial target for CMF action was discussed

ФЕНОЗАН КАЛИЯ ПРЕДОТВРАЩАЕТ ДИСФУНКЦИЮ МИТОХОНДРИЙ В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

Жигачева И.В., Бурлакова Е.Б.

Учреждение Российской академии наук Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Москва, Россия
e-mail: zhigacheva@mail.ru

Митохондрии, являясь одним из регуляторов энергетического метаболизма, играют важную роль в ответе организма на стрессовые воздействия. Приблизительно 1-3% потребляемого митохондриями кислорода в результате 1 или 2 электронного восстановления образует активные формы кислорода (АФК) [1,2]. В физиологических состояниях антиоксидантная система нейтрализуют излишнюю продукцию АФК и поддерживает их концентрацию на довольно низком пикомолярном уровне [3]. Сдвиг антиоксидантно - прооксидантного соотношения в сторону увеличения продукции АФК приводит к развитию окислительного стресса. Смещение этого равновесия осуществляется под влиянием различных стрессовых факторов (при действии токсических веществ, изменении условий окружающей среды, психических нагрузках и т.д.) [4]. Можно предположить, что основным свойством препаратов, обладающих адаптогенной активностью, является снижение продукции АФК, а, следовательно, и снижение интенсивности процессов перекисного окисления липидов в биологических мембранах Поскольку известно, что пространственно-затрудненные фенолы в большинстве случаев обладают антиоксидантными свойствами в качестве объекта исследования был выбран фенозан калия (калиевая соль 2,6-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил-пропионовой кислоты. Для активации ПОЛ использовали модель «старения» - инкубацию митохондрии печени в солевой среде.

Инкубация митохондрий в солевой среде приводит к активации процессов свободно радикального окисления, а следовательно и интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ. При этом содержание продуктов перекисного окисления липидов увеличивается в 3-4 раза. Введение фенозана калия в среду инкубации митохондрий приводит к снижению флуоресценции продуктов ПОЛ и носит дозовую зависимость. Препарат в концентрации 10^{-5}; 10^{-6} и 10^{-7}М оказывает слабое воздействие на интенсивность перекисного окисления липидов. В концентрациях 10^{-8}- 10^{-16} и 10^{-18}- 10^{-22} М фенозан калия снижает интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ до контрольного уровня Полученные данные позволяют предположить, что наиболее эффективное использование препарата для медицинских целей возможно в концентрационном интервале 10^{-9}-10^{-14}М, когда препарат взаимодействует с рецепторами биологических мембран.

Действительно, уже через 1 час после введения крысам препарата в дозе 10^{-14}М происходит увеличение содержания ненасыщенных и снижение содержания насыщенных жирных кислот в мембранах митохондрий печени. Содержание стеариновой кислоты уменьшается в 1,3 раза, пальмитиновой – в 1,5 раза. В это же время содержание линолевой и линоленовой кислот увеличивается в 1,2; 3,6 раза соответственно. В результате отношение ненасыщенных кислот к насыщенным (коэффициент K_1) возрастает с 1,27±0,10 до 2,04±0,06 .Соотношение же суммарного содержания ненасыщенных жирных кислот с 18 углеродными атомами к стеариновой кислоте (коэффициент K_2) возрастает в 1,7 раз. При этом вклад линолевой кислоты в суммарное количество ненасыщенных жирных кислот с 18 углеродными атомами возрастает с 3% в контроле до 33% в опыте. Сходные изменения жирнокислотного состава мембран наблюдались при адаптации животных к холоду [5]. Через 3 часа в суммарной фракции липидов мембран митохондрий процентное содержание насыщенных жирных кислот остается сниженным, а ненасыщенных даже несколько возрастает. В этой дозе препарат в 3,5-4,5 раз увеличивает продолжительность жизни и на 20-30% повышает выживаемость животных (крыс) в условиях гипоксии и низкотемпературного стресса. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования фенозана калия для защиты тканей от свободнорадикальной атаки в условиях ишемии и гипоксии.

Литература

1. *Скулачев В.П.* Явления запрограммированной сиерти. Митохондрии, клетки, органы // СОЖ. 2001. Т.7. №6. С 4-10.
2. *Boveris A., Oshino N., Chance* The cellular production of hydrogen peroxide // Biochem. J. 1972. Vol. 128. P. 617-630.
3. Crack PJ, Taylor J.M. Reactive oxygen species and the modulation of stroke // Free Rad. Biol Med. 2005. Vol. 38. P.1433-1444
4. *Курганова Л.Н.* Перекисное окисление липидов – одна из возможных компонент быстрой реакции на стресс // СОЖ. 2001. Т.7. №6. С. 76-78.
5. *Спиридонова В.А., Агуреев А.П., Юськович А.К.*/Увеличение активности фосфолипазы A_2 в ткани печени при адаптации к холоду и внешний путь окисления НАД-Н. Биол. Науки. 1982. № 3. С.16-21.

POTASSIUM FENOZAN PREVENTS MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN HYPOXIA AND LOW TEMPERATURE STRESS

Zhigacheva I.V., Burlakova E.B.

Institution of the Russian Academy of Sciences: Emanuel Institute of Biochemical Physics, Moscow, Russia
e-mail: zhigacheva@mail.ru

Mitochondria, being one of the regulators of the energy metabolism, play an important role in the organism response to stress condition. Approximately 1-3% of mitochondrial oxygen consumption by 1 or 2 electron reduction forms a reactive oxygen species (ROS) [1,2]. In physiological conditions, antioxidant systems neutralize excessive ROS production, and supports their concentration at low picomolar level [3]. Shift antioxidant - prooxidant ratio toward increasing production of ROS leads to oxidative stress. Shift this balance effects under the influence of various stressors (under the action of toxic substances, changes in the inviromental conditions, psychic stress etc) [4]. One can assume that the basic properties of drugs possessing adaptogenic activity is the reduction of ROS and, consequently, decrease the intensity of lipid peroxidation (LP) in biological membranes. Since it is known that sterically hindered phenols, in most cases, have antioxidant properties, as the object of study was selected product potassium penozan (potassium salt of 2,6-di-tret-butyl-4-hydroxyphenyl-propionic acid. To activation LP has developed a model of “aging” – long-term incubation mitochondria in saline medium.

Incubation of mitochondria in saline media leads to the activation of free radical oxidation, and hence the fluorescence intensity of lipid peroxidation products At the same time the content of lipid peroxidation products increased by 3-4 times. The addition of the preparation resulted in decreasing the LP products fluorescence: the preparation concentration 10^{-5}; 10^{-6} и 10^{-7}M produced an insignificant effect on the intensity of LP processes. The potassium phenozan concentrations10^{-8}- 10^{-16} и 10^{-18}- 10^{-22} M resulted in decreasing the fluorescence intensity of LP products to a control level. These data suggest that the most effective use of the drug for medical purposes may be in the concentration range 10^{-9}- 10^{-14}M, when the drug interacts with receptors of biological membranes.

Really, rats the drug at this dose is 1 hour after injection resulted in higher content of unsaturated and lower content of saturated fatty acids in the membranes of liver mitochondria. The content of stearic acid decreased in 1,3 times, palmitic - in 1,5 times. At the same time, the content, linoleic and linolenic acids increased at 1.2 and 3.6 times, respectively. As result, the ratio of unsaturated to saturated fatty acids increased from 1.27 ± 0.10 to 2.04 ± 0.06 (coefficient K_1). Ratio of unsaturated fatty acids with 18 carbon atoms to stearic acid (coefficient K_2) increases 1.7 times. At the same time the contribution linoleic acid in the total amount of unsaturated fatty acids with 18 carbon atoms increased from 3% in control to 33% in the experiment. Similar changes in fatty acid composition of membranes were observed during the adaptation of animals to cold [5]. After 3 hours in total lipid fraction of membranes of mitochondria the percentage of saturated fatty acids is reduced, and even some unsaturated growing. The introduction of the drug to animals in this dose by 20-30% increased survival of animals under conditions of hypoxia and low temperature stress. These results indicate the possibility of using potassium fenozan for protecting tissues from free radical attack in conditions of ischemia and hypoxia

References

1. *Skulachev V.P.* The phenomenon of programmed death. Mitochondria, cells, organs. Soress Education J. 2001.Vol.7/. №6. P.4-10.
2 *Boveris A., Oshino N., Chance* The cellular production of hydrogen peroxide. Biochem. J. 1972. Vol. 128.P. 617-630.
3 *Crack PJ, Taylor J.M.* Reactive oxygen species and the modulation of stroke. Free Radю Biol. Med. 2005. Vol 38.P.1433-1444.
4 *Kurganova L.N.* Lipid peroxidation- one of the possible components of a rapid response to stress. Soress Education J. 2001.Vol.7. №6. 76-78.
5 *Spiridonova V.A., Agureev A.P., Yus’kovich A.K.* Increased activity of phospholipase A2 in liver tissue during cold adaptation, and the outer pathwaqy of oxidation of NAD-H. Biological Science. 1982. № 3. P.16-21.

САМООРГАНИЗАЦИЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОДНЫХ РАСТВОРОВ МЕБИКАРА НИЗКИХ И СВЕРХНИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ

[1]Кравченко А.Н., [2]Рыжкина И. С., [2]Киселева Ю. В., [2]Коновалов А. И.

[1]Учреждение Российской академии наук Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН,
Москва, Россия
e-mail: kani@server.ioc.ac.ru
[2] Учреждение Российской академии наук Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова
Казанского научного центра Российской Академии наук, Казань, Россия

Многие природные и синтетические биологически активные вещества (БАВ) проявляют биоэффекты в области низких (10^{-11}–10^{-6} моль/л) и сверхнизких (10^{-20}–10^{-12} моль/л) концентраций [1]. Недавно в ИОФХ им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН открыто явление образования наноассоциатов (100–400 нм) в разбавленных водных растворах БАВ низких и сверхнизких концентраций. Установлено, что нелинейные концентрационные зависимости физико-химических свойств растворов (удельная электропроводность χ, поверхностное натяжение σ, pH), параметров наноассоциатов (размер, D; электрокинетический (ζ) потенциал) и биоэффектов взаимосвязаны [2-4].

Для накопления фактов изменения свойств водных растворов БАВ в низких и сверхнизких концентрациях в настоящей работе изучена самоорганизация и физико-химические свойства водных растворов мебикара (2,4,6,8-тетраметил-2,4,6,8-тетрааазбицикло[3.3.0]октандион-2,7) **1**, который применяется для лечения неврозов [5]. Ранее в ИОХ РАН при использовании методов миллиметровой адсорбционной спектроскопии, дифференциальной сканирующей микрокалориметрии и дифференциальной УФ-спектрофотометрии было обнаружено воздействие соединения **1** в концентрации 5 10^{-4} -1 М на структуру воды, а также на структуру и активность модельных макромолекулярных биологических структур белковой природы [6].

Нами методами кондуктометрии, динамического светорассеяния, электрофореза исследованы водные растворы **1** в области концентраций 10^{-20}- 10^{-3} М. Растворы соединения **1**, приготовленные методом последовательных серийных разбавлений, в указанном интервале концентраций характеризуются мономодальным полидисперсным распределением частиц по размерам (индекс полидисперсности ИПД 0,1-0,4), что свидетельствует о правомерности описания совокупности размеров частиц в реальной системе с помощью усредненного диаметра (D). После достижения мономодального распределения размеров наноассоциатов системы сохраняются в неизменном виде в течение нескольких суток.

Установлено, что всю область концентраций можно разделить на два интервала, отличающихся характером концентрационных зависимостей. В первом интервале концентраций 10^{-7}- 10^{-3} М (область существования сольватированных ассоциатов **1**) зависимости удельной электропроводности χ, параметров частиц (D; ζ-потенциал) носят линейный характер, при этом с уменьшением концентрации значения χ, ζ-потенциала падают, а D растет от 170 до 300 нм. Во втором интервале концентраций 10^{-20}-10^{-8} М (область существования наноассоциатов) концентрационные зависимости χ растворов **1**, параметров наноассоциатов носят нелинейный характер, типичный для концентрационных зависимостей изученных ранее растворов БАВ [2-4], что дает основание прогнозировать [7] появление биоэффектов растворов **1** в области низких и сверхнизких концентраций.

Работа выполнена при поддержке Программы 6 ОХНМ РАН и РФФИ (проект № 10-03-00147).

Литература:

1. *Е.Б. Бурлакова* // Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности - ЖРХО. 1999. **43**. № 5.с.3–11.
2. *И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Ю.В. Киселева, академик А.И. Коновалов* // Свойства супрамолекулярных наноассоциатов, образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ - Доклады АН, 2009, **428**, № 4, с. 487-491.
3. *И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Ю.В. Киселева, академик А.И. Коновалов* // Супрамолекулярные системы на основе амфифильных производных биологически активных фенолов: самоорганизация и реакционная способность в широкой области концентраций - Доклады АН, 2009, **428**, № 5, с. 628-632.
4. *И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Е. Д. Шерман, Ю. Н. Валитова, Е. А. Катаев, академик А. И. Коновалов* // Водные растворы макроциклического пиридин-пиррольного соединения низких концентраций: взаимосвязь параметров супрамолекулярных наноразмерных ассоциатов, физико-химических свойств и физиологической активности - Доклады АН, 2010, **433**, № 5, с. 647-651.
5. *М.Д. Машковский.* Лекарственные средства // Новая волна 2007г, т.1, с.83 .
6. *Ю. И. Хургин, О.В. Лебедев, Е.Ю. Максарева, В.А. Завизион, В.А. Кудряшова, М.М. Воробьев, Г.А. Орехова, А.Н. Даниленко.* // Межмолекулярные взаимодействия в водных растворах мебикара - Изв. АН, Сер.хим., 1995, №6, с. 1178-1179.
7. *А.И. Коновалов, И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина* // Заявка на изобретение № 2009106496/15 - БИ 2010, № 24.

THE SELF-ORGANIZATION AND THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF AQUEOUS SOLUTIONS OF MEBICAR IN LOW OR ULTRA-LOW CONCENTRATIONS

[1]Kravchenko A.N., [2]Ryzhkina I.S., [2]Kiseleva Yu.V., [2]Konovalova A.I.

[1]N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
e-mail: kani@server.ioc.ac.ru
[2] Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry,Kazan Research Center, Russian Academy Sciences, Kazan,Tatarstan, Russia

A lot of natural and synthetic biologically active substances (BAS) exert bioeffects in low (10^{-11}–10^{-6} mol/l) and ultralow (10^{-20}–10^{-12} mol/l) concentration regions [1]. A phenomenon of the nanoassociates (100–400 nm) formation in dilute water solutions of low and ultralow concentration BAS has been recently discovered in Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan Scientific Research Center RAS. It has been established that nonlinear concentration relationships of solution physicochemical properties (specific conductivity χ, surface tension σ, pH), nanoassociate parameters (size, D; electrokinetic potential (ζ)) and bioeffects are interrelated [2-4].

To accumulate data on changes in the properties of water solutions of low and ultralow concentration BAS this research focused on the self-organization and physicochemical properties of water solutions of Mebikar (2,4,6,8-tetramethyl-2,4,6,8-tetraazabicyclo [3.3.0]octanedion-2,7) **1**, which is applied for neurosis cure [5]. ZIOC RAS earlier researches on utilizing millimeter absorption spectroscopy, differential scanning calorimetry and differential UV spectrophotometry methods identified an impact of compound **1** in 5x 10^{-4} -1 M concentration on the water structure as well as on the structure and activity of model macromolecular biological structures of the protein nature [6].

We examined water solutions of **1** in the 10^{-20}- 10^{-3} M concentration range using conductometry, dynamic light diffusion, and electrophoresis technologies. Solutions of **1** prepared by in-series dilutions are characterized by the monomodal polydisperse particle size distribution (polydispersity index (PDI) 0.1-0.4) in the foresaid range. This evidences to the validity of the particle size totality description in a real system on the basis of the averaged diameter (D). Upon achieving the monomodal nanoassociate size distribution, systems remain unchanged over a few days.

The overall concentration range can be divided to two intervals differing in the concentration relationship pattern. In the first 10^{-7}- 10^{-3} M concentration interval (a region where solvated associates **1** were detected), specific conductivity χ and particle parameters (D; ζ-potential) dependencies are linear and, as far as concentration decreases, χ and ζ-potential values drop whereas D rises from 170 to 300 nm. In the second 10^{-20}-10^{-8} M concentration interval (a region where nanoassociates **1** were detected), concentration dependencies of χ of solutions **1** and nanoassociate parameters are nonlinear, which is typical for concentration dependencies of the BAS solutions tested earlier [2-4]. Originating from that it is possible to predict [7] an emergence of bioeffects from solutions **1** in the low and ultralow concentration region.

The research was supported by the RAS Ch&MSD Program (ChD-6) and by the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 10-03-00147).

References:

1. *E. B. Burlakova* // Features of the action of ultralow doses of biologically active substances and low intensity physical factors - Rossiiskii Khimicheskii Zhurnal (1999), 43(5), 3-11 (in Russian).
2. *I. S. Ryzhkina. L. I. Murtazina, Yu. V. Kiseleva, and Academician A. I. Konovalov* // Properties of Supramolecular Nanoassociates Formed in Aqueous Solutions of Biologically Active Compounds in Low or Ultra-Low Concentrations - Doklady Physical Chemistry, 2009, 428, Part 2, p. 196–200.
3. . *I. S. Ryzhkina, L. I. Murtazina, Y. V. Kiseleva, A. I. Konovalov* // Supramolecular Systems Based on Amphiphilic Derivatives of Biologically Active Phenols: Self-Assembly and Reactivity over a Broad Concentration Range - Doklady Physical Chemistry, 2009, 428, Part. 2, p. 201-205.
4. *I. S. Ryzhkinaa, L. I. Murtazinaa, E. D. Shermanb, Yu. N. Valitovac, E. A. Kataevd, and Academician A. I. Konovalova* // Low-Concentration Aqueous Solutions of Macrocyclic Pyridine–Pyrrole Compound: Relationship between the Parameters, Physicochemical Properties, and Physiological Activity of Supramolecular Nanosized Associates - Doklady Physical Chemistry, 2010, 433, Part 2, p. 142–146.
5. *M.D. Mashkovsky.* Lekarstvenyie sredstva // Novaya volna. 2007, 1, p.83 (in Russian).
6. *Yu. I. Khurgin, O.V. Lebedev, E.Yu. Maksareva, V..A. Zavizion, V.A. Kudryashova, M.M. Vorob`ev, G.A. Orekhova, A.N. Danilenko.* // Intramolecular interactions in aqueous solutions of mebicar. - Russ. Chem. Bull. 1995, 44. No.6, p. 1138-1139.
7. A. I. Konovalov, I. S. Ryzhkina. L. I. Murtazina, // Zayavka na izobretenie № 2009106496/15 - BI 2010, № 24 (in Russian).

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО В РАСТВОРАХ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ПОЛИФОФАТА НАТРИЯ КАК ОДНА ИЗ ПРИЧИН МЕТАХРОМАЗИИ

[1]Лукьяненко И.В., [1]Мартынюк В.С., [2]Громозова Е.Н.

[1]Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина
[2]Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: mavis@science-center.net

Метахромазия - это широко известное явление цветовой и тональной вариабельности окраски клеток и биологических тканей при использовании определенных красителей. Красители, дающие метахроматическое окрашивание, как правило, относятся к группе трифенилметановых, тиозиновых и оксазиновых органических соединений. Метахромазия может проявляться в очень широком цветовом диапазоне – от синего до красного. Это свойство красителей давно используется в биологических и медицинских исследованиях для изучения структуры клеток и тканей, а также для выявления патологических процессов.

Однако остается ряд невыясненных вопросов, например, связанных с тем, что метахромазия нередко проявляется в популяции клеток, которые находятся в одних и тех же постоянных условиях и находящихся условно в одном и том же физиологическом состоянии, но при окрашивании все равно имеют разные цветовые и тональные особенности. Еще более загадочными являются периодические и квазипериодические вариации метахромазии во времени. На такие временные вариации окрашивания клеток впервые обратили внимание Вельховер С.Т. и Чижевский А.Л. [1,2]. Причины таких вариаций разные авторы связывали с природными факторами, которые контролируются космической погодой. В последние десятилетия такая точка зрения находит экспериментальное подтверждение, в частности обнаружен корреляция индексов метахромазии с потоком космических лучей [3]. Однако указанный феномен все еще далек от понимания его природы.

Одним из ярких примеров метахромазии является изменение цвета метиленового синего при окраске гранул полифосфатов (волютина) [4]. На этом основании гранулы волютина часто называют метахроматическими гранулами. Неорганические полифосфаты представляют собой линейные полимеры ортофософрной кислоты, в которой кислотные остатки связаны между собой ангидридными связями. В живых клетках размеры полифосфатных цепей варьируют в широких пределах – от 3 до 1000 звеньев [4]. В настоящее время полифосфаты выявлены в клетках практически у всех видов живых организмов, они принимают участие в регуляции разнообразных метаболических процессов и их состояние (длина полимерной цепи, степень разветвленности, конформационное состояние и т.д.) в определенной степени отражает функциональное состояние клеток.

В связи с вышеуказанным целью данной работы было изучение оптических свойств тиозинового красителя метиленового синего в растворах неорганических полифосфатов с разной длиной полимерной цепи и разной концентрации.

Нами обнаружено, что основные параметры спектров поглощения метиленового синего при его взаимодействии с полифосфатами сильно варьируют в зависимости от концентрации полимера и длины полифосфатной цепи. В комплексе с полифосфатами разные формы метиленового синего характеризуются максимумом поглощения на длинах волн, лежащих в относительно широком диапазоне: мономер - 671.9-674.5 нм, димер - 620-644 нм и тример – 574.0-592.0 нм. Для тримерных форм, находящихся в комплексе в полифосфатом, характерен, как правило, красный сдвиг максимума поглощения в среднем на 10 нм по с равнению с тримерными комплексами красителя, находящимися в воде.

Вариации спектров поглощения связаны с нелинейными изменениями образования моно-, ди- и тримерных форм красителя, ассоциированного с полифосфатом, при этом в растворах с низкой концентрацией полимера и с относительно малой (16-18 звеньев) длиной цепи доминируют тримерные комплексы.

Основные параметры спектров поглощения метиленового синего в растворах полифосфатов флуктуируют во времени. Причины таких флуктуаций малопонятны и возможно связаны с влиянием на исследуемые растворы неконтролируемых в эксперименте внешних фоновых физико-химических факторов.

Литература:

1. *Вельховер С.Т.* Годовой ход метахромазии волютина коринебактерийной клетки// Микробиология, 1936, т.XV, вып.5., С.731-736.
2. *Чижевский А.Л.* Некоторые микроорганизмы, как индикаторы солнечной активности и предвестники солнечных вспышек / Авиационная и космическая медицина /, М. «Медицина», 1963г.с.485-487.
3. *Громозова Е.Н., Григорьев П.Е., Качур Т.Л., Войчук С.И.* Влияние космических факторов на реакцию метахромазии волютиновых гранул Saccharomyces cerevisiae/ Геофизические процессы и биосфера, 2010,т.9.,№2. С.67-76.
4. *Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В.* Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. – М.: « Научный мир» 2005.- 216 с.

THE VARIABILITY OF THE OPTICAL PROPERTIES OF METHYLENE BLUE IN SOLUTIONS OF INORGANIC POLIFOFATA SODIUM AS THE CAUSE OF METACHROMASIA

[1]Lukyanenko I.V., [1]Martynyuk V.S., [2]Gromozova E.N.

[1]Kievsky National Taras Shevchenko University, Kyiv, Ukraine
[2]Institute of Microbiology and Virology. Zabolotny NAS, Kyiv, Ukraine
e-mail: mavis@science-center.net

Metachromasia - a widely known phenomenon of color and tone color variability of cells and biological tissues using certain dyes. Dyes, giving the metachromatic staining, as a rule, are a group of triphenylmethane, oxazine tiozinovyh and organic compounds. Metachromasia may be manifested in a very wide color range - from blue to red. This property dyes have long been used in biological and medical research to study the structure of cells and tissues, as well as to identify the pathological processes.

However, there remain several outstanding problems such as those related to the fact that metachromasia is often manifested in a population of cells that are in the same constant conditions and are suspended in the same physiological state, but the staining still have different color and tonal features. Even more puzzling are the periodic and quasi-periodic variations metachromasia in time. Velhover S.T. and Chizhevsky A.L. were first who noticed to such time variations of staining [1,2]. The reasons for these variations is unknown and different authors attributed to natural factors that are controlled by space weather. In recent decades, this view is confirmed experimentally, in particularly, it was found a correlation index metachromasia with the flow of cosmic rays [3]. However, this phenomenon is still far from understanding its nature.

One striking example of metachromasia is to change the color of methylene blue when stained granules of polyphosphates (volutin) [4]. The volutin granules often called metachromatic granules. Inorganic polyphosphates are linear polymers of ortophosphorous acid where acidic residues are linked anhydride bonds. In living cells the size of polyphosphate chains vary widely - from 3 to 1000 units [4]. Currently polyphosphates detected in cells of all species of living organisms, they are involved in the regulation of various metabolic processes and their status (the length of the polymer chain, the degree of branching, conformation state, etc.) reflects the functional state of cells.

The objective of this work was to study the optical properties of dye methylene blue in solutions of inorganic polyphosphates with different lengths of polymer chains and varying concentrations.

We found that the main parameters of the absorption spectra of methylene blue when it interacts with polyphosphates vary greatly that depend on the concentration of the polymer and the length of the polyphosphate chain. In conjunction with polyphosphates different forms of methylene blue are characterized absorption peak at wavelengths that vary within a relatively wide range: monomer - 671.9-674.5 nm, dimer - 620-644 nm and trimer - 574.0-592.0 nm. The trimeric forms, which are in the complex polyphosphate, is characterized by the red shift of the absorption maximum by 10 nm comparatively to trimeric complexes of the dye in the water.

Variations of the absorption spectra associated with nonlinear changes in formation of mono-, di- and trimeric forms of the dye associated with the polyphosphate, while in solutions with low concentrations of polymer and a relatively low (16-18 units) long chain is dominated by trimeric complexes.

The main parameters of the absorption spectra of methylene blue in solutions of polyphosphates fluctuate over time. The reasons for such fluctuations are understood and may relate to the influence of an uncontrolled external background physical and chemical factors.

References:

1. *Velhover S.T.* Annual variations of metachromasia volyutina korinebakteriynoy cells / Microbiology,1936, XV, issue 5., C.731-736.
2. *Chizhevsky A.L.* Some micro-organisms as indicators of solar activity and the precursors of solar flares / Aviation and space medicine / Moscow, Medicine ed., 1963. P.485-487.
3. *Gromozova E.N., Grigoriev P.E., Kachur T.L., Voychuk S.I.* Influence of cosmic factors on the reaction of metachromasia volyutinovyh granules Saccharomyces cerevisiae / Geophysical processes and the Biosphere, 2010, V.9., № 2. P.67-76.
4. *Kulaev I.S., Vahabov V.M., Kulakovskaya T.V.* Macromolecular Inorganic polyphosphates: biochemistry, cell biology, and biotechnology. - Moscow: Scientific World, 2005 . 216 p.

МОДУЛЯЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВЕЩЕСТВ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫМИ ПОЛЯМИ: ФАКТЫ И ГИПОТЕЗЫ

[1]Мартынюк В.С., [2]Цейслер Ю.В., [1]Артеменко А.Ю.

[1]ННЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко
e-mail: mavis@science-center.net
[2]Международный открытый университет развития человека «Украина», Киев, Украина
e-mail: yuliya.tseysler@gmail.com

Накопленный массив данных свидетельствует о том, что воздействие электромагнитных полей (ЭМП) изменяет активность биологически активных веществ природного и искусственного происхождения. Однако вопрос о механизмах такого влияния остается неизученным. В последние годы авторами получены экспериментальные данные, свидетельствующие о различных первичных механизмах действия низкочастотных электромагнитных полей на живые системы.

На примерах влияния ЭМП на тимоциты и модуляции ингибирующего действия хромогликата натрия на функциональную активность тучных клеток обсуждается вопрос о возможных мишенях действия указанного физического фактора в системах внутриклеточной сигнализации.

На примере ЭМП-модуляции H_2O_2-индуцированного апоптоза тимоцитов рассматриваются возможные механизмы, связанные с прямым влиянием ЭМП на физико-химические свойства водно-коллоидных систем, что является основой изменений агрегационных свойств белков и низкомолекулярных веществ. Такие изменения могут быть одной из причин нарушения структурно-функциональных свойств белков и последующей активацией синтеза белков теплового шока. Одновременно с этим альтернативным путем влияния низкочастотных магнитных полей на систему внутриклеточной регуляции может быть связано с влиянием ЭМП на свободнорадикальные процессы, которые являются пусковым механизмом запрограммированной гибели клеток.

Обосновывается идея о том, что в живых системах имеет место сложная интерференция и интеграция различных механизмов действия ЭМП на всех уровнях организации живого. Такая интерференция и интеграция может обеспечиваться основными механизмами внутриклеточной сигнализации.

MODULATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF SUBSTANCES BY ELECTROMAGNETIC FIELDS: FACTS AND HYPOTHESIS

[1]Martynyuk V.S., [2]Tseysler Yu.V., [1]Artemenko O.Yu.

[1]ESC "Institute of Biology" Taras Shevchenko National University of Kyiv
e-mail: mavis@science-center.net
[2]International Open University of Human Development "Ukraine", Kiev, Ukraine
e-mail: yuliya.tseysler @ gmail.com

Present day experimental data testify to changes of activity of biologically active substances of natural and artificial origin by electromagnetic fields (EMF). However, the question of the mechanisms of these effects remains unknown. In recent years the authors have obtained experimental evidence of different primary mechanisms of action of low-frequency electromagnetic fields on living systems.

The question about possible targets of the specified physical factors in the intracellular signaling is discussed for experiments on influence of EMF on thymocytes and modulation of the inhibitory effect of sodium chromoglycate on functional activity of mast cells.

The possible mechanisms related to the direct influence of electromagnetic fields on the physicochemical properties of aqueous colloidal systems, that is the basis of changes in aggregation properties of proteins and low molecular weight substances, are discussed through the experiments on EMF-modulation of H_2O_2-induced apoptosis of thymocytes.

Such changes may be one reason why violations of the structural and functional properties of proteins and subsequent activation of synthesis of heat shock proteins. Simultaneously, the alternative route of influence of low-frequency magnetic fields on intracellular system of regulation can be attributed to the influence of EMF on free radical processes that triggered programmed cell death.

The idea that complicated interference and the integration of different mechanisms of action of electromagnetic fields at all levels of the organization of living systems is substantiated in frame of resonant an non-resonant theories. Such interference and integration can be realized through the basic mechanisms of intracellular signaling.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ГОРМЕТИЧЕСКОГО ОТКЛИКА БИОСИСТЕМЫ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД НА ДЕЙСТВИЕ РАСТВОРОВ N,N-ДИФЕНИЛГУАНИДИНОВОЙ СОЛИ ДИГИДРОКСИМЕТИЛФОСФИНОВОЙ КИСЛОТЫ

[2]Масагутова Э.М., [1]Муртазина Л.И., [1]Рыжкина И.С., [3]Шерман Е.Д., [2]Павлова Т.П., [2]Фридланд С.В., [1]Коновалов А.И.

[1]Институт органической и физической химии им. А.Е.Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия
e-mail: ryzhkina@iopc.ru
[2]КГТУ, ИХТИ, Казань, Россия
[3]Казанский (Приволжский) Федеральный университет

Для повышения эффективности процесса биохимической очистки высокотоксичных сточных вод применяются биорегуляторы активности микроорганизмов. В настоящее время проводится поиск новых синтетических биорегуляторов, способных в низких (включая пикомолярные) и сверхнизких (фемтомолярные и ниже) концентрациях повышать скорость очистки сточных вод. Такой подход значительно снижает расход биорегулятора и исключает его воздействие на очищенную воду. Однако применение в технологии очистки сточных вод биологически активных веществ (БАВ) в низких и сверхнизких концентрациях связано с рядом трудностей, важнейшая из которых – отсутствие знаний, способных объяснить и предсказать возникновение сложного горметического ответа биосистемы, т.е. возникновение нелинейных концентрационных зависимостей биоэффектов, перемену знака биоэффекта при переходе из одной области концентраций в другую и т.д. [1-3]. В последнее десятилетие концепция гормезиса вызывает большой интерес у широкого круга специалистов, но его практическое использование в фармакологии, токсикологии, медицине сдерживается отсутствием объяснения физико-химической сущности. Проведенное недавно исследование самоорганизации и свойств водных растворов некоторых БАВ в области низких и сверхнизких концентраций растворенных веществ позволило впервые показать, что причиной возникновения нелинейных концентрационных зависимостей физико-химических свойств растворов является образование и перестройка наноассоциатов, в результате которой изменяется их размер и электрокинетический потенциал [4-6].

В настоящей работе представлены результаты изучения самоорганизации в широкой области концентраций 10^{-12}-10^{-2} М систем на основе нового биорегулятора активности микроорганизмов N,N-дифенилгуанидиновой соли дигидроксиметилфосфиновой кислоты (**1**) в воде и в растворе NaCl (0,9%), а также сравнение со свойствами регулятора роста растений мелафена. Показано, что водные растворы соединения **1** в широкой области концентраций (10^{-12} - 10^{-2} М) представляют собой самоорганизующиеся системы, в которых в различных концентрационных интервалах 10^{-2} - 10^{-4} , 10^{-5} - 10^{-9} , 10^{-10} - 10^{-12} М образуются ассоциаты, отличающиеся по размеру и дзета-потенциалу. Установлено, что в этих же интервалах концентраций раствор **1** оказывает различное влияние на очистку сточной воды: ухудшает при 10^{-4} М, слабо активирует («зона молчания») в области 10^{-5} - 10^{-9} М, значительно интенсифицирует при 10^{-10} - 10^{-11} М. Концентрация 10^{-5} М является пороговой: выше и ниже этой концентрации образуются ассоциаты различной природы, что обуславливает способность растворов **1** отрицательно или положительно влиять на процесс очистки сточной воды. Изучение самоорганизации в среде физиологического раствора показало, что мелафен способен к образованию стабильных наноассоциатов в этой среде, в то время как для **1** этот процесс осложнен. Методом корреляционного анализа установлено, что в высокоразбавленных растворах **1** (10^{-10}- 10^{-12} М), интенсифицирующих очистку сточной воды, зависимости дзета-потенциала от размера наночастиц, а также дзета-потенциала от удельной электропроводности растворов **1** статистически и практически значимы (r=0,84, p=0,036 и r =0,86, p=0,013, соответственно), в то время как в области «зоны молчания» (10^{-9} - 10^{-5} М) статистической зависимости между этими параметрами нет. Совокупность полученных данных подтверждает гипотезу об определяющей роли самоорганизации растворов БАВ в механизме гормезиса.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 10-03-00147).

Литература:

1. *В.В. Булатов, Т.Х. Хохоев, В.В. Дикий, С.В. Заонегин, В.Н. Бабин* // Проблема малых и сверхмалых доз в токсикологии. Фундаментальные и прикладные аспекты - Рос. хим. ж., 2002, Т.46, №6, С. 58-62.
2. Hormesis: a revolution in biology, toxicology and medicine. 1st ed.; Springer: New York, 2009.
3. *Calabrese E.J.*// Hormesis: Principles and Applications for Pharmacology and Toxicology - Am. J. Pharm. & Toxicol, 2008, V. 3 (1), P. 56-68.
4. *Коновалов А.И., Рыжкина И.С., Муртазина Л.И, Тимошева А.П., Шагидуллин Р.Р., Чернова А.В., Аввакумова Л.В., Фаттахов С.Г.* // Супрамолекулярные системы на основе дигидрата меламиновой соли бис(оксиметил)фосфиновой кислоты (мелафена) и поверхностно-активных веществ. Сообщение 1. Строение и самоассоциация мелафена в воде и хлороформе - Изв. АН. Сер. Хим, 2008, № 6, С. 1207-1214.
5. *И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Ю.В. Киселева, А.И. Коновалов* // Свойства супрамолекулярных наноассоциатов, образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ - Доклады АН, 2009, т. 428, № 4, С. 487-491.
6. *И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Ю.В. Киселева, А.И. Коновалов* // Супрамолекулярные системы на основе амфифильных производных биологически активных фенолов: самоорганизация и реакционная способность в широкой области концентраций - Доклады АН, 2009, т. 428, № 5, С. 628-632.

PHYSICOCHEMICAL SUBSTANTIATION OF HORMETIC RESPONSE OF BIOSYSTEMS FOR WASTEWATER TREATMENT ON THE ACTION OF SOLUTIONS OF N, N-DIPHENYLGUANIDIN SALT OF DIHYDROXYMETHYLPHOSPHINIC ACID

[2]Masagutova E. M., [1]Murtazina L.I., [1]Ryzhkina I.S., [3]Sherman E.D., [2]Pavlova T.P., [2]Fridlan S.V., [1]Konovalov A.I.

[1] A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry KazRC RAS, Kazan, Russia
e-mail: ryzhkina@iopc.ru
[2]Kazan State Technological University, Engineering Institute of Chemical Technology, Kazan
[3]Kazan (Volga region) Federal University

To improve the process of biochemical treatment of highly toxic wastewater are applied bioregulators activity of microorganisms. Now we are carried out search of the new synthetic bioregulators capable at low (including picomolar) and ultralow (femtomolar and below) concentrations to increase the rate of wastewater treatment. This approach can considerably reduce the consumption of a bioregulator and exclude practically its influence on the purified water. However, the application of biologically active substances at low and ultralow concentrations in wastewater treatment technology is connected with a number of difficulties. One of the more important aspects of the problem is the absence of the knowledge that can explain and predict the occurrence of difficult hormetic answer of biosystem, i.e. the origin of nonlinear concentration dependences of the bioeffects, change “a sign” of bioeffects at the transition from one concentration range to another [1-3]. In the last decade the concept of hormesis is of great interest from a wide range of professionals, but its practical use in pharmacology, toxicology, medicine hampered by lack of explanation of physicochemical nature. A recent study of self-organization and properties of the aqueous solutions of certain biologically active compounds in the region of low and ultralow concentrations of dissolved substances allowed for the first time show that the cause of the nonlinear concentration dependences of physicochemical properties of the solutions is the formation and restructuring nanoassociates, which resulted in changes in their size and electrokinetic potential [4 -6].

In the report presents the results of a study of self-organization in a wide concentration range of 10^{-12}-10^{-2} M of systems based on new bioregulator activity of microorganisms N, N-diphenylguanidin salt of dihydroxymethylphosphinic acid (**1**) in water and in a solution of NaCl (0,9%), and a comparison with the properties of a plant growth regulator melafen. It is shown that aqueous solutions of 1 in a wide range of concentrations (10^{-12} - 10^{-2} M) are self-organizing systems, in which in the different range of concentrations 10^{-2} - 10^{-4}, 10^{-5} - 10^{-9} , 10^{-10} - 10^{-12} M associates are formed. These associates differ on size and ζ-potential. It is installed that in the same range of concentrations of solution **1** has different effects on wastewater treatment: degrades at 10^{-4} M, weakly activates ("zone of silence") in 10^{-5} - 10^{-9} M, significantly intensifies at 10^{-10} - 10^{-11} M. Concentration of 10^{-5} M is a threshold: above and below this concentration are formed associates of different nature, which leads to the ability of solutions 1 to affect negatively or positively on wastewater treatment. The study of self-organization in an media of saline showed that melafen is able to form stable nanoassociates in this media, while for 1 this is process complicated. Method of correlation analysis showed that in highly diluted solutions of **1** (10^{-10}- 10^{-12} M), intensifying of wastewater treatment, dependences the zeta-potential from nanoparticle size and zeta-potential from the specific electrical conductivity of solutions are statistically and practically significant ($r = 0,84$, $p = 0,036$ and $r = 0,86$, $p = 0,013$, respectively), whereas in the "zone of silence" (10^{-9} - 10^{-5} M) statistical dependence between these parameters is not. Taken together, these data support the hypothesis about the decisive role of self-organization BACs solutions in the mechanism of hormesis.

This work was supported by the RFBR (Grants № 10-03-00147).

References:

1. *V.V. Bulatov, T. H. Hohoev, V.V. Dikii, S.V. Zaonegin, V.N. Babin* // The problem of small and ultra-low doses in toxicology. Fundamental and Applied Aspects – Rus. Chem.J., in Russia, 2002, 46, №6, C. 58-62.
2. Hormesis: a revolution in biology, toxicology and medicine. 1st ed.; Springer: New York, 2009.
3. *Calabrese E.J.* // Hormesis: Principles and Applications for Pharmacology and Toxicology - Am. J. Pharm. & Toxicol, 2008, V. 3 (1), P. 56-68.
4. *A. I. Konovalov, I. S. Ryzhkina, L. I. Murtazina, A. P. Timosheva, R. R. Shagidullin, A. V. Chernova, L. I. Avvakumova and S. G. Fattakhov* // Supramolecular systems based on the melamine salt of bis(hydroxymethyl)phosphinic acid (melafen) dihydrate and surfactants. 1. Structure and self-association of melafen in water and chloroform - *Russ. Chem. Bull, Int. Ed.*, 2008, 57, 1231-1238.
5. *I. S. Ryzhkina, L. I. Murtazina, Y. V. Kiseleva, A. I. Konovalov* // Properties of Supramolecular Nanoassociates Formed in Aqueous Solutions of Biologically Active Compounds in Low or Ultra Low Concentrations - Doklady Physical Chemistry, 2009, 428, 2, p. 196-200.
6. *I. S. Ryzhkina, L. I. Murtazina, Y. V. Kiseleva, A. I. Konovalov* // Supramolecular Systems Based on Amphiphilic Derivatives of Biologically Active Phenols: Self-Assembly and Reactivity over a Broad Concentration Range - Doklady Physical Chemistry, 2009, 428, 2, p. 201-205.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ: ОЧЕВИДНОСТЬ ВЛИЯНИЯ ВРЕМЕННЫХ, ХРОНОЛОГИЧЕСКИХ И ГОЕГРАФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Поляк Э.А.

Екатеринбург, Россия
e-mail: maket@bk.ural.ru

В работах [1-2] рассмотрены возможности естественной систематизации хронологических данных в связи с изменениями солнечной активности. При этом методология, осуществленная в химии (Д.Дальтон, Ш.Жерар, Д.Менделеев) перенесена на астрофизические данные изменений солнечной активности, начиная с 1610 г., обобщенные в исследованиях школы К.Вольфа [3] и так или иначе отраженные в более поздних работах [4,5]. В результате предложен относительный параметр Р, характеризующий относительную временную удаленность систематизируемой даты от ближайших эпох минимума и максимума солнечной активности. Показано [6-7], что по своему физическому смыслу этот параметр представляет собой отношение энергетических импульсов, по всей вероятности ведущих свое начало от «энергии времени» (А.Н. Козырев, В.П. Казначеев). Энергетический сомножитель, вероятно, соизмерим с кТ, а сами импульсы носят характер слабых и сверхслабых воздействий [8]. Однако отношения импульсов представляют собой вполне макроскопические значения, которые весьма чувствительны к изменениям временных, хронологических и календарных данных. Эти исследования просто и естественно устанавливают наличие энергетической неравноценности временных интервалов. Численные значения модуля Р стимулируют разделение их на три группы: примыкающие к датам эпох минимума и максимума соответственно (Р>2) и промежуточную (Р меньше или равно 2). Трехгрупповые циклы по идее дополняют собой известные 12-летние циклы восточного календаря [9, с.15-17]. Очевидно, что 12-летние циклы также могут быть охарактеризованы при помощи параметра Р, благодаря чему существенно увеличивается их астрофизическая и биофизическая значимость. Параметр Р как отношение парных энергетических импульсов может быть использован также при осуществлении систематизации во внутригодовом (междумесячном), внутримесячном и внутрисуточном форматах. Очевидно, что импульсы вызываются потоками электронов или других заряженных частиц. Эти потоки зависят еще и от географических факторов.

Энергетические импульсы, связанные с изменениями солнечной активности, подчеркивают роль процессов в жидкой воде, связанных с ее структурными особенностями. Благодаря этим процессам жидкая вода живых организмов должна выступать в качестве детектора с запоминающими и распределительными функциями. Однако, это трудно наблюдать изнутри биосистем в соответствии с «принципом относительности». Поэтому энергетические импульсы, связанные с изменениями солнечной активности и устанавливающие неравноценность календарных, временных интервалов, имеют первостепенное значение.

Литература:

1. *Поляк Э.А.* Поэзия, как инструмент познания – Екатеринбург: изд. Союз писателей, 2005 г., С. 8-18.
2. *Поляк Э.А.* IV Международный Конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». – С.Петербург, 2006. Тезисы, стр. 147. Сборник избр. трудов, с. 88.
3. *Эйгенсон М.С., Гневышев М.Н., Рубашев Б.М., Оль А.И.* Солнечная активность и ее земные проявления. – М: Гос. изд. технико-теорет. Литературы. 1948, с.30-34.
4. Солнечная активность и солнечно-земные связи. – Л.: Изд. ФТИ. 1987, с.57.
5. *Владимирский Б.М., Темурьянц Н.А., Мартынюк В.С.* Космическая погода и наша жизнь. – Фрязино: Изд. Век 2, с.15.
6. Поляк Э.А. Некоторые гуманитарно-методологические аспекты открытия Д.И. Менделеева. – Екатеринбург: «Печатное поле», 2008. 35 с.
7. *Поляк Э.А.* XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Москва, 23-28 сентября 2007 г. Тезисы докладов. – М.: «Граница», 2007 г., т.4, с.325.
8. *Галль Л.Н., Дроздов А.В., Галль Н.Р.* IV Международный Конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». – С.Петербург, 2006. Тезисы, стр. 147. Сборник избр. трудов, с. 1-9.
9. *Волдомонов Н.В.* Календарь: прошлое, настоящее, будущее. – М: Наука, 1987, с.15-17.

UTILIZATION OF BIOLOGYCAL ACTIVE SUBSTANCES: THE OBVIOUS INFLUENCES OF CHRONOLOGYCAL, CALENDAR AND GEOGRAPHICAL FACTORS

Polyak E.A.

Ekaterinburg, Russia
e-mail: maket@bk.ural.ru

Natural systematization of the chronological data in connection with sun's activity are considered at work [1,2]. Metodological of approach at chemistry (D.Dalton, Sch.Jerar, D.Mendeleev) is divided into astrophisical data of changes sun's activity for K.Volf and their follower [3,4,5]. The relative factor P characteristic for relative time's distant of systematizing dates from nearest minimums and maximums of sun's activity according to is proposed in consequence. Multificated numerator and denominator of expression P an energetic multiplier [6,7]. Thus factor P is ratio of energetic impulses after phisical meaning. This impulses take place from "time's energy" probably (A.N. Kozyrev, V.P. Kaznacheev). An energetic multiplier is commensurable with kT or still smaller values. Impulses are weak and weakest influences [8], but their ratioes are macroscopic numeral badges of module P do founding for division their on three group: around dates of epochs "minimum's" and "maximum's" of Sun's activity, accordingly (P>2) and intermediate (P<2) [2,3]. Such division completes itself the division for 12-years cycles [9, p.15-17]. This cycles can be discribe by changes of factor P [2,9]. Values P are highly sensitive to modigications of chronologycal and calendar data. This investigations ascertain presense of energetical inequality of calendarical interval at simply and natural. An establishment of physical sence its as ratio of energetics impulses must to rase importance of Eastern cyclical calendar. Factor P can be considered as ratio of twin energetic impulses and calculated for years, months (moons), twenty four hours (days). Impulses are roused by streams of electrones, it is obviuos. This streams depend on geographical factor also. Discovery of existence of energetic impulses connected with changes of sun's activity acknowledges role of processes proceeding in liquid water. This processes add to liquid water properties of detection, distribution and reminiscent. However that it is difficult to observe from with in biosystems accordingly "relativ's principle". Therefore energetical impulses in connection with sun's activity and inequalenty of calendarical interval attach importance.

References:

1. *Поляк Э.А.* Поэзия, как инструмент познания – Екатеринбург: изд. Союз писателей, 2005 г., С. 8-18.
2. *Поляк Э.А.* IV Международный Конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». – С.Петербург, 2006. Тезисы, стр. 147. Сборник избр. трудов, с. 88.
3. *Эйгенсон М.С., Гневышев М.Н., Рубашев Б.М., Оль А.И.* Солнечная активность и ее земные проявления. – М: Гос. изд. технико-теорет. Литературы. 1948, с.30-34.
4. Солнечная активность и солнечно-земные связи. – Л.: Изд. ФТИ. 1987, с.57.
5. *Владимирский Б.М., Темурьянц Н.А., Мартынюк В.С.* Космическая погода и наша жизнь. – Фрязино: Изд. Век 2, с.15.
6. *Поляк Э.А.* Некоторые гуманитарно-методологические аспекты открытия Д.И. Менделеева. – Екатеринбург: «Печатное поле», 2008. 35 с.
7. *Поляк Э.А.* XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. Москва, 23-28 сентября 2007 г. Тезисы докладов. – М.: «Граница», 2007 г., т.4, с.325.
8. *Галль Л.Н., Дроздов А.В., Галль Н.Р.* IV Международный Конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине». – С.Петербург, 2006. Тезисы, стр. 147. Сборник избр. трудов, с. 1-9.
9. *Волдомонов Н.В.* Календарь: прошлое, настоящее, будущее. – М: Наука, 1987, с.15-17.

ВЗАИМОСВЯЗЬ САМООРГАНИЗАЦИИ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И БИОЭФФЕКТОВ ВЫСОКОРАЗБАВЛЕННЫХ РАСТВОРОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Рыжкина И. С., Коновалов А. И.

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

Комплексом физико-химических методов впервые установлено, что в водных растворах ряда веществ (биоантиоксиданты, регуляторы роста растений, витамины, гормоны), проявляющих широкий спектр биологического действия и перспективных для практического использования в малых и сверхмалых концентрациях, происходит образование стабильных супрамолекулярных наноассоциатов, размер (100-300 нм) и электрокинетический потенциал (от -2 до -20 мВ) которых нелинейно зависит от концентрации вещества в области 10^{-6}-10^{-20} М [1, 2]. В докладе обсуждаются новые результаты [3-7], предлагаются и обосновываются подходы для решение одной из наиболее важных и интригующих проблем естествознания – появления нелинейных концентрационных зависимостей физико-химических свойств и биоэффектов растворов в области сверхнизких концентраций, а также установления механизма действия растворов биологически активных веществ (БАВ) в этом интервале концентраций на биологические системы различной степени сложности.

Исследование взаимосвязи физико-химических свойств (удельная электропроводность, поверхностное натяжение, pH, диэлектрическая проницаемость) и параметров наноассоциатов, проведенное методом корреляционного анализа показало, что появление максимальных значений удельной электропроводности растворов в области сверхнизких концентраций связано с увеличением электрокинетического потенциала образующихся в растворах частиц [3,4,6].

Установлено, что растворы изученных БАВ проявляют биоэффекты в той же области низких и сверхнизких концентраций, в которой происходят нелинейные изменения физико-химических свойств, что позволяет прогнозировать появление биэффекта в высокоразбавленных водных растворах БАВ [5].

В работе предлагается гипотеза объяснения горметического биоэффекта систем, приводятся данные, свидетельствующие о том, что расхождения в параметрах ассоциатов, образующихся в области обычных и низких концентраций, являются наиболее вероятной причиной, обуславливающей перемену знака биоэффекта в различных интервалах концентраций растворов БАВ/6/.

Анализ результатов изучения концентрационных зависимостей параметров наноассоциатов, физико-химических свойств и биоэффектов растворов, исследование влияния низких концентраций БАВ на супрамолекулярные каталитические системы, физико-химические параметры клеточных мембран позволяет сделать вывод о том, что пространственно организованные наноассоцаты БАВ, образованные с участием структур воды, ответсвенны за синергетические изменения физико-химических свойств [7], появление высокой каталитической активности и биоэффектов разбавленных растворов.

Работа выполнена при поддержке Программы 6 ОХНМ РАН и РФФИ (проект № 10-03-00147)

Литература:

1. *И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Ю.В. Киселева, А.И. Коновалов* // Свойства супрамолекулярных наноассоциатов, образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ - Доклады АН, 2009, т. 428, № 4, С. 487-491.
2. *И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Ю.В. Киселева, А.И. Коновалов* // Супрамолекулярные системы на основе амфифильных производных биологически активных фенолов: самоорганизация и реакционная способность в широкой области концентраций - Доклады АН, 2009, т. 428, № 5, С. 628-632.
3. *И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Е. Д. Шерман, Ю. Н. Валитова, Е. А. Катаев, А. И. Коновалов* // Водные растворы макроциклического пиридин-пиррольного соединения низких концентраций: взаимосвязь параметров супрамолекулярных наноразмерных ассоциатов, физико-химических свойств и физиологической активности - Доклады АН, 2010,т. 433, № 5, С. 647-651.
4. *И.С. Рыжкина, Ю.В. Киселева, Л.И. Муртазина, Н.П. Пальмина, В.В.Белов, Е.Л.Мальцева, Е.Д. Шерман, А.П. Тимошева, А.И. Коновалов* // Влияние концентраций α-токоферола на самоорганизацию, физико-химические свойства растворов и структуру биологических мембран - Доклады АН, 2011, в печати.
5. *Коновалов А.И., Рыжкина И.С., Муртазина Л.И.*Заявка на изобретение № 2009106496/15// БИ 2010, № 24.
6. *И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Е.Д. Шерман, М.Е. Пантюкова, Э.М. Масагутова, Т.П. Павлова, С.В. Фридланд, А.И. Коновалов* // Физико-химическое обоснование горметического отклика биосистемы очистки сточных вод на действие растворов N,N-дифенилгуанидиновой соли дигидроксиметилфосфиновой кислоты - Доклады АН, 2011, т. 438, № 2, в печати.
7. *Рыжкина И.С., Киселева Ю.В., Муртазина Л.И., Валитова Ю.Н., Соловьева С.Е., Пилишкина Л.М., Коновалов А.И.*// Наноразмерные смешанные агрегаты алкилированных п-сульфонатокаликс[n]аренов и цетилтриметиламмонийбромида: самоорганизация и каталитическая активность - Изв. АН. Сер. Хим, 2010, 7,С. 1297-1305.

RELATIONSHIP OF SELF-ORGANIZATION, PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND BIOEFFECT HIGHLY DILUTED SOLUTIONS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

Ryzhkina I.S., Konovalov A.I.

A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry KazRC RAS, Kazan, Russia
e-mail: ryzhkina@iopc.ru

It is established for the first time that in aqueous solutions of some substances (bioantioxidants, plant growth regulators, vitamins, hormones), which exhibit biological effects in a wide range of concentration and are promising for practical use at low and ultra-low concentrations, the formation of stable supramolecular nanoassociates occurs, the size (100-300 nm) and electrokinetic potential (from -2 to -20 mV) of these nanoassosiates depend nonlinearly on the concentration of the substance of 10^{-6}-10^{-20} M [1, 2].

In the report new results and the approaches for the decision of one of the most important and intriguing problems of natural sciences – appearances of non-linear concentration dependences of physicochemical properties and bioeffects of solutions in the region of the low and ultralow concentration are considered, and also the mechanism of action of solutions of biologically active substances (BAS) in this interval of concentration on biological systems of a various level of complexity are proposed and are justified [3-7].

The relationship between physicochemical properties (specific electrical conductivity, surface tension, pH, dielcometric permeability) and the parameters of nanoassociates was studied by correlation analysis. It was shown that the appearance of the maximum values of the electrical conductivity of solutions at ultralow concentrations occurs due to the increase of the electrokinetic potential of particles formed in solutions [3, 4, 6].

It is found that the solutions of studied BAS exhibit bioeffects in the same range of low and ultralow concentrations, in which there are non-linear changes in physicochemical properties. Originating from that it is possible to predict [8] appearance of bioeffects in highly dilutions aqueous solutions of biologically active substances [5].

The report proposes a hypothesis to explain hormetic bioeffects of systems. The differences in the parameters of the associates formed in the region of common and low concentrations is the most probable reason responsible for the bioeffect sign change in different concentration ranges of solutions of BAS [6].

Analysis of the results of the study of the concentration dependences of the parameters nanoassociates, physicochemical properties and bioeffects solutions, investigation of the effect of low concentrations of BAS on the supramolecular catalyst systems, physicochemical parameters of cell membranes suggests that spatially organized nanoassociates of BAS formed with the participation of water structures are responsible for the synergistic changes of physicochemical properties [7], the appearance of a high catalytic activity and bioeffects of dilute solutions.

This work was supported by the Division of Chemistry and Material Science of the Russian Academy of Sciences (Fundamental Research Program no. 6) and the RFBR (Grants № 10-03-00147).

References:

1. *I. S. Ryzhkina, L. I. Murtazina, Y. V. Kiseleva, A. I. Konovalov* // Properties of Supramolecular Nanoassociates Formed in Aqueous Solutions of Biologically Active Compounds in Low or Ultra-Low Concentrations - Doklady Physical Chemistry, 2009, 428, 2, p. 196-200.
2. *I. S. Ryzhkina, L. I. Murtazina, Y. V. Kiseleva, A. I. Konovalov* // Supramolecular Systems Based on Amphiphilic Derivatives of Biologically Active Phenols: Self-Assembly and Reactivity over a Broad Concentration Range - Doklady Physical Chemistry, 2009, 428, 2, p. 201-205.
3. *I. S. Ryzhkina, L. I. Murtazina, E. D. Sherman, Y. N. Valitova, E. A. Kataev, A. I. Konovalov* // Low-Concentration Aqueous Solutions of Macrocyclic Pyridine–Pyrrole Compound: Relationship between the Parameters, Physicochemical Properties, and Physiological Activity of Supramolecular Nanosized Associates - Doklady Physical Chemistry, 2010, 433, 2, p.142-46.
4. *I. S. Ryzhkina, Y. V. Kiseleva, L. I. Murtazina, N. P. Palmina, V.V. Belov, E.L. Maltseva, E. D. Sherman, A. P. Timosheva A. I. Konovalov* // Effect of concentrations of α-tocopherol on self – organization, physicochemical properties of solutions and the structure of membranes- Doklady Physical Chemistry, in press.
5. *A. I. Konovalov, I. S. Ryzhkina, L. I. Murtazina* - The request for inventions № 2009106496/15// BI 2010, № 24.
6. *I.S. Ryzhkina, L.I. Murtazina, E. D. Sherman, M. E. Pantyukova, E. M. Masagutova, T.P. Pavlova, S.V. Fridland, A. I. Konovalov* // Physicochemical substantion of hormetic response of biosystems for wastewater treatment on the action of N,N – diphenylguanidin salt of dihydroxymethylphosphoinic - Doklady Physical Chemistry, т. 438, in press.
7. *I. S. Ryzhkina, Yu. V. Kiseleva, L. I. Murtazina, Yu. N. Valitova, S. E. Solov´yeva, L. M. Pilishkina, A. I. Konovalova* // Nanosized mixed aggregates of alkylated p-sulfonatocalix[n]arenes and cetyltrimethylammonium bromide: self-organization and catalytic activity - Russian Chemical Bulletin, International Edition, 2010, Vol. 59, No. 7, P. 1327-1335.

САМООРГАНИЗАЦИЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОДНЫХ И ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРОВ РЯДА СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ В ОБЛАСТИ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ

[1]Рыжкина И.С., [1]Муртазина Л.И., [1]Тимошева А.П., [2]Лукашев Н.В., [3]Малеванная Н.Н., [1]Коновалов А.И.

[1]Институт органической и физической химии им. А.Е.Арбузова КазНЦ РАН, Казань, Россия
e-mail: ryzhkina@iopc.ru
[2]Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
[3]ННПП «НЭСТ М»

Общим свойством гормонов является высокая биологическая активность, которая достигается при низких концентрациях. Известно, что гормоны положительно влияют на биосистемы в оптимально низких концентрациях, превышение которых приводит к отрицательным эффектам. Существующие в настоящее время гипотезы механизма действия гормонов не могут объяснить природы этого повсеместно распространенного и чрезвычайно важного для жизни растений и животных явления.

Для объяснения высокой биологической активности гормонов в области низких концентраций нами изучены самоорганизация и физико-химические свойства водных и органических (хлороформ) растворов стероидных гормонов животного (эстрон (**1**), тестостерон (**2**)) и растительного (24-эпибрассинолид (**3**)) происхождения в области 10^{-15} – 10^{-3} моль/л. Растительный гормон 24-эпибрассинолид, обладающий ростостимулирующим и антистрессовым действием [1], синтезирован согласно [2]. Комплексом физико-химических методов (динамическое светорассеяние, кондуктометрия, pH-метрия, диэлькометрия) получены концентрационные зависимости физико-химических свойств и параметров ассоциатов водных и органических (хлороформ) растворов **1-3** в широкой области концентраций. Установлено, что всю область концентраций изученных соединений **1-3** можно разделить на два интервала, отличающихся характером концентрационных зависимостей и природой ассоциатов. В первом интервале концентраций 10^{-4}- 10^{-3} М (область существования сольватированных ассоциатов **1-3**) зависимости удельной электропроводности χ, pH и размеров частиц D носят линейный характер. Во втором интервале концентраций 10^{-15} - 10^{-5} М (область существования наноассоциатов) концентрационные зависимости χ растворов **1-3**, параметров наноассоциатов имеют нелинейный вид, типичный для концентрационных зависимостей изученных ранее растворов БАВ [3-7], что дает основание прогнозировать [8] появление биоэффектов растворов **1-3** в области низких концентраций. Отметим, что несмотря на различное строение **1-3** концентрации, при которых наблюдались экстремальные значения физико-химических свойств и параметров наноассоциатов, лежат в одном интервале 10^{-10} - 10^{-7} М .

Концентрационные зависимости диэлькометрической проницаемости ε = f (C) водных и органических растворов стероидов **1-2** нелинейны, имеют несколько точек перелома, в одинаковых интервалах концентраций, связанных с образованием и перестройкой ассоциатов (10^{-4} М) и наноассоциатов (10^{-10} - 10^{-8} М) и коррелируют с экстремальными изменениями параметров наноассоциатов и электропроводности растворов **1-2** в воде. Аналогичные результаты получены нами при изучении самоорганизации и физико-химических свойств растворов регулятора роста растений мелафена и α-токоферола в воде и хлороформе [1,5].

Работа выполнена при поддержке Программы 6 ОХНМ РАН и РФФИ (проект № 10-03-00147)

Литература:

1. Полифункциональность действия брассиностероидов. Сборник научных трудов. Москва: «НЭСТ М», 2007, 360 с.
2. *Чепраков А.В., Филатов М.А., Лукашев Н.В., Малеванная Н.Н*// Способ получения 24-эпибрассинолида – Ru 2 272 044 C1, 20.03.2006, БИ №8.
3. *Коновалов А.И., Рыжкина И.С., Муртазина Л.И, Тимошева А.П., Шагидуллин Р.Р., Чернова А.В., Аввакумова Л.В., Фаттахов С.Г.*// Супрамолекулярные системы на основе дигидрата меламиновой соли бис(оксиметил)фосфиновой кислоты (мелафена) и поверхностно-активных веществ. Сообщение 1. Строение и самоассоциация мелафена в воде и хлороформе - Изв. АН. Сер. Хим, 2008, № 6, С. 1207-1214.
4. *И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Ю.В. Киселева, А.И. Коновалов* // Свойства супрамолекулярных наноассоциатов, образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ - Доклады АН, 2009, т. 428, № 4, С. 487-491.
5. *И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Ю.В. Киселева, А.И. Коновалов* // Супрамолекулярные системы на основе амфифильных производных биологически активных фенолов: самоорганизация и реакционная способность в широкой области концентраций - Доклады АН, 2009, т. 428, № 5, С. 628-632.
6. *И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Е. Д. Шерман, Ю. Н. Валитова, Е. А. Катаев, А. И. Коновалов* // Водные растворы макроциклического пиридин-пиррольного соединения низких концентраций: взаимосвязь параметров супрамолекулярных наноразмерных ассоциатов, физико-химических свойств и физиологической активности - Доклады АН, 2010, т. 433, № 5, С. 647-651.
7. *И.С. Рыжкина, Ю.В. Киселева, Л.И. Муртазина, Н.П. Пальмина, В.В. Белов, Е.Л. Мальцева, Е. Д. Шерман, А.П Тимошева, академик А.И. Коновалов* // Влияние концентраций α-токоферола на самоорганизацию, физико-химические свойства растворов и структуру биологических мембран – Доклады АН, в печати.
8. *Коновалов А.И., Рыжкина И.С., Муртазина Л.И.*Заявка на изобретение № 2009106496/15// БИ 2010, № 24.

SELF-ORGANIZATION AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF AQUEOUS AND ORGANIC SOLUTIONS OF SOME STEROID HORMONES IN THE REGION OF LOW CONCENTRATIONS

[1]Ryzhkina I.S., [1]Murtazina L.I., [1]Timosheva A.P., [2]Lukashev N. V., [3]Malevannaya N.N., [1]Konovalov A.I.

[1] A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry KazRC RAS, Kazan,Russia
e-mail: ryzhkina@iopc.ru
[2] Lomonosov Moscow State University
[3] NNPP «NEST M»

The general property of hormones is a high biological activity which is reached at low concentration. It is known that hormones positively influence biosystems in optimally low concentration. The excess of hormones leads to negative effects. The existing hypotheses for the mechanism of action hormones can't explain the nature of the phenomenon which is everywhere widespread and extremely important for life of plants and animals.

For an explanation the high biological activity of hormones at low concentrations, we studied self-organization and physicochemical properties of aqueous and organic (chloroform) solutions of steroid hormones (estrone (1), testosterone (2) and 24-epibrassinolide (3)) in the range of 10^{-15} - 10^{-3} M. The plant hormone 24-epibrassinolid, which possesses stimulating growth and antistressful action [1], was synthesized according to [2]. The concentration dependence of the physicochemical properties and parameters of the associates of aqueous and organic (chloroform) solutions of **1-3** in a wide range of concentrations was found by the complex of physicochemical methods (dynamic light scattering, conductometry, pH-metry, dielcometric titration). It is installed that all region of concentration of the studied compounds **1-3** can be divided into two intervals, differing by character of the concentration dependence and the nature associates. In the first 10^{-4}-10^{-3} M concentration interval (a region where solvated associates **1-3** were detected) specific conductivity χ, pH and particle parameters (D) dependencies are linear. In the second 10^{-15} - 10^{-5} M concentration range (the region of existence nanoassociates), concentration dependence of χ of solutions **1-3,** parameters nanoassociates are nonlinear, which is typical for concentration dependencies previously studied solutions of biologically active substances in low concentration [3-7]. Originating from that it is possible to predict [8] appearance of bioeffects solutions **1-3** in low concentrations.

Note that despite the different structure of **1-3** concentrations at which observed extremal values of physicochemical properties and nanoassociate parameters, lie in the range 10^{-10} - 10^{-7} M.

Concentration dependences of dielcometric permeability $\varepsilon = f(C)$ of aqueous and organic solutions of steroids **1-2** are nonlinear, have some points of a fracture, in the same concentration range connected with formation and restructuring of associates (10^{-4}) and nanoassociates (10^{-10} - 10^{-8}) and correlate with extremal changes of nanoassociate parameters and electrical conductivities of solutions **1-2** in water. Similar results were obtained by us in studying the self-organization and physicochemical properties of solutions of plant growth regulator melafen and α-tocopherol in water and chloroform [1,5].

This work was supported by the Division of Chemistry and Material Science of the Russian Academy of Sciences (Fundamental Research Program no. 6) and the RFBR (Grants № 10-03-00147).

References:

1. Polyfunctionality of action of brassinosteriods. Collection of scientific papers. Moscow: "Nest M", 2007, 360.
2. *Cheprakov A.V., Filatov M.A., Lukashev N. V., Malevannaya N.N.* // Method of obtaining 24-epibrassinolide– Ru 2 272 044 C1, 20.03.2006, BI №8.
3. *A. I. Konovalov, I. S. Ryzhkina, L. I. Murtazina, A. P. Timosheva, R. R. Shagidullin, A. V. Chernova, L. I. Avakumova and S. G. Fattakhov* // Supramolecular systems based on the melamine salt of bis(hydroxymethyl)phosphinic acid (melafen) dihydrate and surfactants. 1. Structure and self-association of melafen in water and chloroform- *Russ. Chem. Bull, Int. Ed.*, 2008, 57, 1231-1238.
4. *I. S. Ryzhkina, L. I. Murtazina, Y. V. Kiseleva, A. I. Konovalov* // Properties of Supramolecular Nanoassociates Formed in Aqueous Solutions of Biologically Active Compounds in Low or Ultra-Low Concentrations - Doklady Physical Chemistry, 2009, 428, 2, p. 196-200.
5. *I. S. Ryzhkina, L. I. Murtazina, Y. V. Kiseleva, A. I. Konovalov* // Supramolecular Systems Based on Amphiphilic Derivatives of Biologically Active Phenols: Self-Assembly and Reactivity over a Broad Concentration Range - Doklady Physical Chemistry, 2009, 428, 2, p. 201-205.
6. *I. S. Ryzhkina, L. I. Murtazina, E. D. Sherman, Y. N. Valitova, E. A. Kataev, A. I. Konovalov* // Low-Concentration Aqueous Solutions of Macrocyclic Pyridine–Pyrrole Compound: Relationship between the Parameters, Physicochemical Properties, and Physiological Activity of Supramolecular Nanosized Associates - Doklady Physical Chemistry, 2010, 433, 2, p.142-46.
7. *I. S. Ryzhkina, Y. V. Kiseleva, L. I. Murtazina, N. P. Palmina, V.V. Belov, E.L. Maltseva, E. D. Sherman, A. P. Timosheva A. I. Konovalov* // Effect of concentrations of α-tocopherol on self – organization, physicochemical properties of solutions and the structure of membranes- Doklady Physical Chemistry, in press.
8. *A. I. Konovalov, I. S. Ryzhkina, L. I. Murtazina* The request for inventions № 2009106496/15// BI 2010, № 24.

МОДИФИЦИРУЮЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ СВЕРХНИЗКОЙ ЧАСТОТЫ НА ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ МЕЛАНИНА ПРИ ПЕРОКСИД-ИНДУЦИРОВАННОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ТИМОЦИТОВ

Собко В.М., Мартынюк В.С.

ННЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, Киев, Украина
e-mail: mavis@science-center.net; svitya@ua.fm

Меланин синтезируется многими клетками, выполняет различные физиологические функции. Он является важным фотопротекторным фактором, поглощает ультрафиолетовое излучение. Это вещество также демонстрирует антиоксидантные, иммуномодулирующие, антиканцерогенные и стресс-протекторные свойства, что позволяет его использовать в медицине. Одновременно с этим, меланин все шире используется и в пищевой промышленности.

Давно известно, что электромагнитный фон природного и техногенного происхождения в диапазоне низких частот является важным фактором окружающей среды. Электромагнитные волны способны вызывать разнообразные биологические эффекты, среди которых особый интерес вызывает их возможное влияние на запрограммированную гибель клеток. В настоящее время механизмы влияния электромагнитных волн низкочастотного диапазона на клеточные процессы мало исследованы и требуют тщательного изучения. Но исследования комбинированных воздействий низкочастотного электромагнитного поля (ЭМП) в сочетании с различными химическими факторами, в частности такими, как меланин или пероксид водорода, представляет значительный интерес, так как в реальных условиях в окружающей среде живые организмы подвергаются несколько воздействиям одновременно. В связи с этим целью работы было исследовать уровень жизнеспособности, ранние морфологические изменения структуры хроматина тимоцитов и оценить уровень фрагментации ДНК при действии меланина (5 мкг/л), пероксида водорода (100 мМ) и переменного электромагнитного поля частотой 8 Гц 25 мкТл при различном комбинировании воздействий и при различных экспозициях. Препарат меланина (коммерческое название: полифенолкарбоксильний комплекс Антарктических черных дрожжей «Nadsoniella nigra») произведено компанией «Чага» (Украина) из дрожжей Nadsoniella nigra штамм Х-1 и любезно предоставлен профессором Т.В. Береговой.

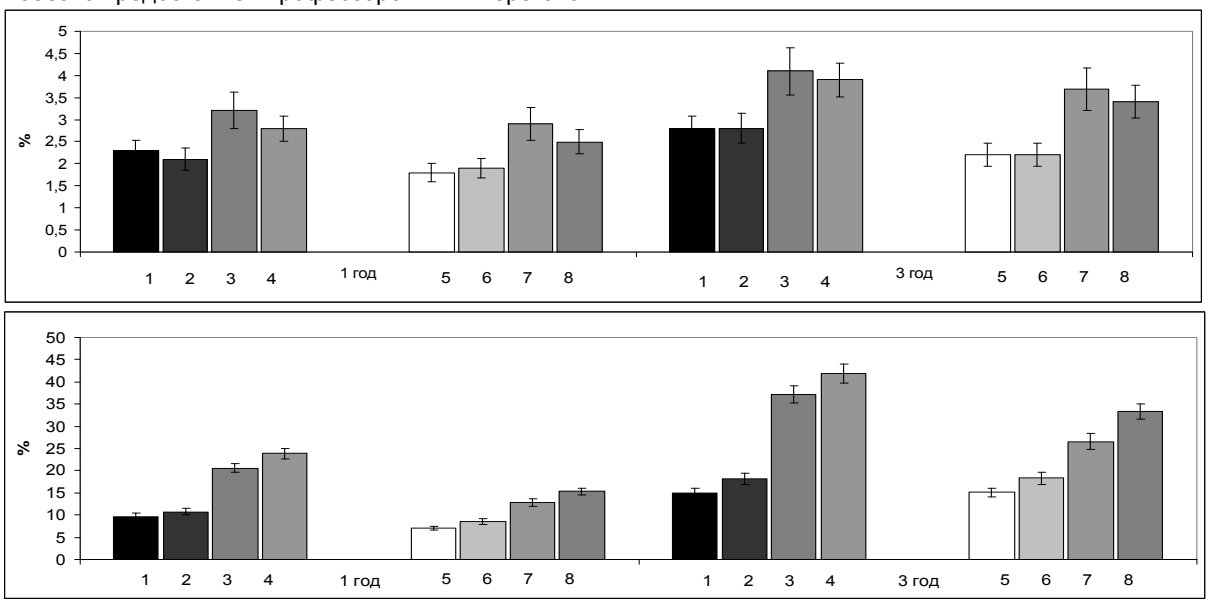


Рис. Количество поврежденных тимоцитов в суспензии в % по отношению к общему числу клеток.
Примечания: некроз – верхний рисунок, апоптоз – нижний рисунок; 1- контроль; 2 - ЭМП; 3 - H_2O_2; 4 - ЭМП +H_2O_2; 5 - меланин; 6 - меланин+ЭМП; 7 - меланин+H_2O_2; 8 - меланин+ЭМП +H_2O_2

Обнаружено, что при действии перекиси водовода, как и ожидалось, наблюдается увеличение количества клеток с признаками апоптоза и уменьшение с признаками некроза. Но при комбинированном воздействии с ЭМП частотой 8 Гц этот эффект усиливается. Увеличение количества клеток с признаками апоптоза в условиях действия перекиси водорода и одновременном воздействии ЭМП происходит в основном за счет клеток с конденсированным хроматином, что, вероятно, свидетельствует об усилении активации механизмов инициации апоптоза при воздействии ЭМП.

Меланин демонстрировал выраженные протекторные эффекты по отношению к повреждающему действию перекиси водорода, но эти эффекты проявлялись не в полной мере в условиях воздействия ЭМП частотой 8 Гц.

MODIFICATION ACTION OF ELECTROMAGNETIC FIELDS OF LOW FREQUENCY ON THE PROTECTIVE EFFECT OF MELANIN IN PEROXIDE-INDUCED DAMAGE OF THYMOCYTES

Sobko V.M., Martynyuk V.S.

ESC «Institute of Biology» of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine
e-mail: mavis@science-center.net; svitya@ua.fm

Melanin is synthesized by many cells, it performs a variety of physiological functions. It is an important photoprotective factor, which absorbs ultraviolet radiation. This substance also demonstrates antioxidant, immunomodulatory, anticarcinogenic, and stress-protective properties allowing its use in medicine. Along with this, melanin has been increasingly used in food industry.

It has long been known that the electromagnetic background of natural and anthropogenic origin at low frequencies is an important factor in the environment. Electromagnetic waves can cause a variety of biological effects, among which special interest is their possible impact on programmed cell death. Currently, the mechanisms of influence of electromagnetic waves by low frequency on cellular processes poorly investigated and require careful study. But studies of combined effects of low-frequency electromagnetic fields (EMF) with various chemical factors, in particular, such as melanin or hydrogen peroxide, is of considerable interest, since in real conditions in the environment, living organisms are exposed to several influences simultaneously. Thereby, the aim of this study was to investigate the level of viability, early morphological changes in chromatin structure of thymocytes and to assess the level of DNA fragmentation under the action of melanin (5 mg /l), hydrogen peroxide (100mM) and an alternating electromagnetic field with frequency of 8 Hz 25 mT at different combined impacts, and at various exhibitions. The specimen of melanin (commercial name: polyphenol carboxyl complex Antarctic black yeast «Nadsoniella nigra») was produced by "Chaga" (Ukraine) from yeast Nadsoniella nigra strain X-1 and kindly provided by Professor T.Beregova.

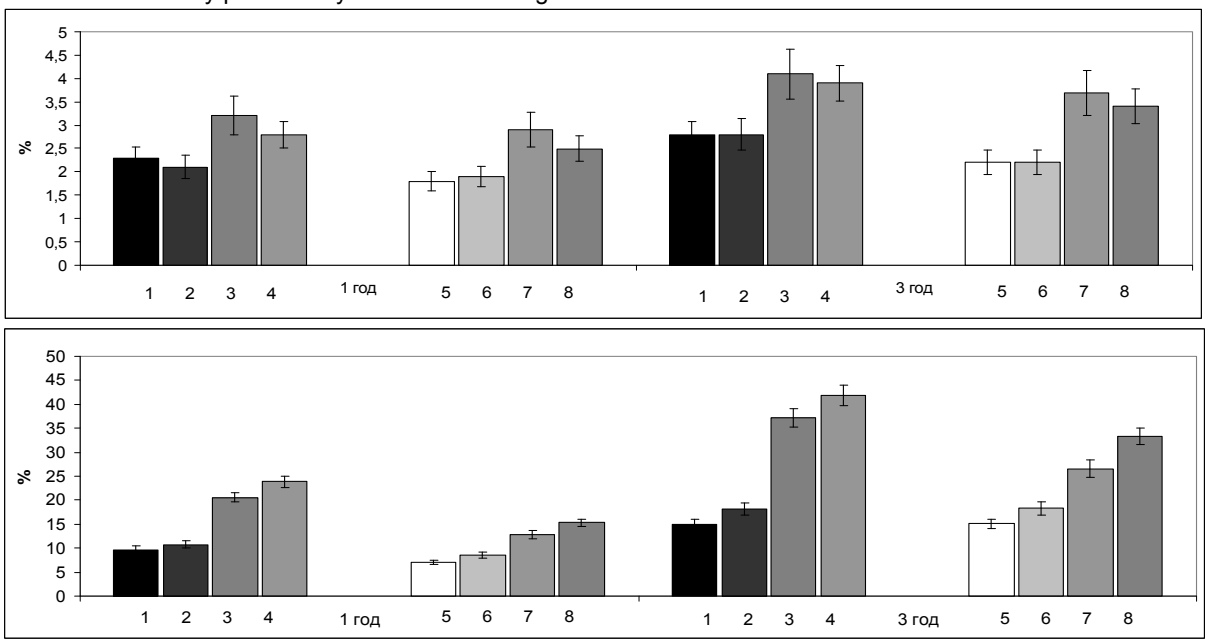


Fig. 2. The number of damaged thymocytes in suspension was counted in percentages relatively to the total number of cells. Notes: necrosis - the top figure, apoptosis - the lower figure, 1 - control 2 - EMP 3 - H_2O_2, 4 - EMF + H_2O_2; 5 - melanin, 6 - melanin + EMF, 7 - melanin + H_2O_2; 8 - melanin + EMF + H_2O_2

It was found that the action of peroxide caused an increase in the number of cells with apoptosis signs and reduction of necrosis signs, as expected. Moreover, the combined effects of EMF with frequency of 8 Hz amplified this effect. Augmentation of the cell number with apoptosis signs under the action of hydrogen peroxide and simultaneous exposure to EMF was mainly due to cells with condensed chromatin, which probably indicated an increase in the activating mechanisms of apoptosis initiation when samples were exposed to EMF.

Melanin showed expressed protective effect against the damaging effect of hydrogen peroxide, but these effects were not fully appeared under the influence of EMF frequency of 8 Hz.

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФЕНОЗАНА И ПРЕПАРАТОВ ИЗ КЛАССА ОКСАЗОЛОВ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ГЛИКОЛИЗА И СТРУКТУРУ МЕМБРАН КЛЕТОК МОЗГА МЫШЕЙ

Трещенкова Ю. А., Герасимов Н.Ю., Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б.

Институт биохимической физики им. Н. М. Эммануэля РАН, Москва, Россия
e-mail: tresch@sky.chph.ras.ru

Фенозан из группы экранированных фенолов является антиоксидантом, обладает широким спектром действия (влияет на активность ферментов, антиокислительную активность клеточных липидов). Препараты 2,5-дифенил-1,3-оксазол (ДФО) и его производное йодметилат (ЙМ-ДФО) с нетрадиционным характером действия, обладают радиозащитными свойствами. Изучали действие препаратов после предварительного введения фенозана на гликолитические ферменты и структурные свойства мембран клеток мозга мышей. Альдолаза и лактатдегидрогеназа (ЛДГ) являются ключевыми ферментами гликолитического пути клеток. Биохимические свойства (Vmax,Km) этих ферментов и структура мембран (микровязкость) могут изменяться при различных заболеваниях и являться чувствительными мишенями к действию химических (веществ) и физических факторов (ионизирующее излучение). Фенозан вводили в малых ($^{10-}$14 моль/кг) и высоких ($^{10-}$4 моль/кг) дозах за час до введения препаратов ДФО.

Субклеточные структуры (цитоплазму, микросомы и синаптосомы) получали с помощью дифференциального центрифугирования, в которых определяли кинетические параметры (Vmax, Km) ферментов. Микровязкость определяли методом ЭПР с двумя зондами, локализующимися в разных областях бислоя мембран.

В цитоплазме обе дозы фенозана (почти в равной степени) увеличивают Vmax/мг белка и Km альдолазы. Совместное действие фенозана и ДФО (1 мг/кг) увеличивали, а с ДФО (60 мг/кг) несколько снижали Vmax/мг белка альдолазы. В микросомах нашли противоположную направленность изменений параметров альдолазы. Совместное действие ЙМ-ДФО с фенозаном в малых дозах практически не влияло на Vmax/мг белка альдолазы в цитоплазме и существенно уменьшало в микросомах.

Напротив, фенозан 10^{-14} мг/кг уменьшал Vmax/мг белка ЛДГ в цитоплазме. Обе дозы фенозана почти не влияли на параметры ЛДГ в микросомах. При совместном действии ДФО (1 или 60 мг/кг), ИМ-ДФО (16 мг/кг) и фенозана увеличение параметров ЛДГ наиболее выражено для малых доз в цитоплазме и микросомах. Таким образом, выявлена противоположная направленность изменений параметров ферментов что, возможно, имеет адаптивный характер для метаболизма и регуляции гликолиза в клетке.

Показано, что обе дозы фенозана (в большей степени малая доза) уменьшали микровязкость в области липидной компоненты (16 и 5%) и, практически, не влияли на микровязкость в области белок-липидных контактов мембран микросом. Совместное действие фенозана в дозе 10^{-14} моль/кг и ДФО в дозах 1 и 60 мг/кг не изменяло микровязкость разных областей бислоя мембран по сравнению с контролем. Совместное действие фенозана в дозе 10^{-4} моль/кг и разных доз ДФО и ЙМ-ДФО уменьшали микровязкость в области липидной компоненты (7-13%) и незначительно увеличивали микровязкость в области белок-липидных контактов мембран.

Обе дозы фенозана незначительно влияли на микровязкость мембран синаптосом. После введения фенозана 10^{-14} моль/кг и ДФО в дозе 1 мг/кг микровязкость увеличивалась в области липидной компонеты (10%) и уменьшаласьв области белок-липидных контактов (17%) бислоя мембран и, наоборот, ДФО в дозе 60 мг/кг уменьшал микровязкость в области липидной компоненты бислоя мембран. После введения фенозана в дозе 10^{-4} моль/кг влияние ДФО на микровязкость мембран синаптосом выражены в меньшей степени. ЙМ-ДФО (16 мг/кг) уменьшал (15%) микровязкость в области липидной компонеты бислоя мембран

На модельных мембранах в условиях in vitro показано, что альдолаза и ЛДГ могут взаимодействовать с фосфолипидами мембран. В работе получена обратная взаимосвязь между микровязкостью мемран и Vmax ферментов при совместном действии ДФО и фенозана 10^{-14} моль/кг. После действия ДФО и фенозана 10^{-4} моль/кг взаимосвязь для альдолазы отсутствовала, а для ЛДГ имела положительную направленность.

Полученные данные свидетельствуют о сложном характере связей и закономерностей изменений активностей ферментов на разных уровнях организации клетки, что на наш взгляд характерно для регуляторных ферментов.

COMBINED ACTION OF PHENOZAN AND DRUG FROM THE CLASS OF OXAZOL THE ACTIVITY OF ENZYMES OF GLYCOLYSIS AND MEMBRANE STRUCTURE OF BRAIN CELLS MICE

Treshchenkova Yu. A. Gerasimov N.Y., Goloshchapov A.N., Burlakova E.B.

Institute of Biochemical Physics. NM Emanuel Academy of Sciences, Moscow, Russia
e-mail:tresch@sky.chph.ras.ru

Phenozan from the group of hindered phenols, has properties antioxidant, as well as properties not associated with its antioxidant properties. Preparation of 2,5-diphenyl-1 ,3-oxazole (DPO) and its derivative iodinemetilat (IM-DPO) with unconventional action, have radioprotective properties. It was studied the effect of drugs DPO, after preliminary injection of phenozan into mice on glycolytic enzymes and structural properties of the membranes of mice brain cells. Aldolase and lactate dehydrogenase (LDH) are key enzymes of the glycolytic path in cells. Biochemical properties (Vmax/mg of protein, Km) of these enzymes and the structure of membranes (microviscosity) can vary in various diseases and are sensitive targets for action of chemicals (substances) and physical factors (ionizing radiation). Phenozan injected in small (10-14 mol / kg) and high (10-4 mol / kg) doses, one hour before the administration of different doses of DPO.

Kinetic parameters (Vmax, Km) of enzymes were determined in subcellular structures (cytoplasm, microsomes, and synaptosomes) obtained by differential centrifugation. Microviscosity was determined by ESR with two probes localized in different regions of the bilayer membranes.

In the cytoplasm both of phenozan doses (almost equally) increased Vmax and Km aldolase. The combined effect of phenozan and DPO in dose 1 mg / kg increased, and in dose 60 mg / kg reduces the Vmax aldolase. In microsomes have been found the opposite changes of parameters of aldolase. The combined effect of IM-DPO with phenozan in small doses, had almost no effect on Vmax aldolase in the cytoplasm and significantly reduced Vmax in microsomes.

On the contrary, phenozan in dose 10-14 mg / kg reduced the Vmax of LDH in the cytoplasm. Both doses of phenozan had almost no effect in the parameters of LDH in the microsomes. The combined action of DPO (1 or 60 mg / kg), IM-DPO (16 mg / kg) and phenozan increased of parameters of LDH was most pronounced for small doses in the cytoplasm and microsomes. Thus, revealed the opposite changes in of enzymes of parameters may have an adaptive character on the metabolism and regulation of glycolysis in the cell.

It was shown that both doses of phenozan (mostly low dose) reduced the microviscosity of surface lipid bilayer regions (16 and 5%) and had almost no effect on the microviscosity of membrane lipid layers adjacent to protein. The combined effect of phenozan in dose of 10-14 mol / kg and DPO in doses of 1 and 60 mg / kg did not changed the microviscosity of different regions of the bilayer of membranes compared with the control. The combined effect of phenozan in dose of 10-4 mol / kg and different doses of DPO and IM-DPO decreased microviscosity of surface lipid bilayer regions (7-13%) and increased the microviscosity in membrane lipid layers adjacent to protein.

Phenozan at both doses had little effect on the microviscosity of membranes of synaptosomes. Injection of phenozan in dose10-14 mol / kg and DPO in dose of 1 mg / kg increased microviscosity of surface lipid bilayer regions by 10% and decreased the microviscosity of membrane lipid layers adjacent to protein by 17% and, conversely, DPO in dose of 60 mg / kg decreased the microviscosity of surface lipid bilayer regions. After the injection phenozan in dose 10-4 mole / kg DPO effect on the microviscosity of membranes synaptosomes are expressed to a lesser extent. IM-DPO (16 mg / kg) reduced of microviscosity membrane of surface lipid bilayer regions by 15% .

On model membranes in vitro it was shown that aldolase and LDH may interact with phospholipids of membranes. In this study inverse relationship between microviscosity of membrane and Vmax of enzymes in the result as combined action of DPO and phenozan in dose10-14 mol / kg was obtained. After the action of DPO and phenozan in dose 10-4 mol / kg for aldolase was no relationship.

The findings suggest that the complex nature of the relationship and patterns of changes of enzyme activity at different levels of organization cells, which in our view is characteristic of regulatory enzymes.

СЛАБОЕ МАГНИТНОЕ ПОЛЕ КРАЙНЕ НИЗКОЙ ЧАСТОТЫ УГНЕТАЕТ ВЫЗВАННУЮ K^+-ДЕПОЛЯРИЗАЦИЕЙ И АЦЕТИЛХОЛИНОМ СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛАДКИХ МЫШЦ

Цимбалюк О.В., Мартынюк В.С.

ННЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, Киев, Украина
e-mail: otsymbal@bigmir.net; mavis@science-center.net

В настоящее время биологическая активность электромагнитных полей диапазона крайне низких частот надежно установлена. Одним из возможных первичных механизмов действия данного фактора может быть связан с модуляцией активности систем меж- и внутриклеточной регуляции. Одним проявлений такого действия могут быть феномены усиления или ослабления биологической активности разных веществ природного и синтетического происхождения [1,2].

Методом тензометрии в изометрическом режиме было исследовано индуцированную ацетилхолином и гиперкалиевым раствором сократительную активность кольцевых гладкомышечных полосок caecum крысы в условиях воздействия переменного магнитного поля (МП) с частотой 8 Гц индукцией 25 мкТл. Эффективность электро- и фармакомеханического сопряжения при этих условиях определяли путем регистрации сокращений, вызванных K^+-деполяризацией (ГКС, 80 мМ) и ацетилхолином (АХ, 10 мкм). Кинетику сократительных ответов анализировали методом Ф.В. Бурдыги и С.А. Костерина [3], который предусматривает расчет независимых от амплитуды нормированных максимальных скоростей отдельно фаз сокращения и расслабления. Все сокращения характеризовали по показателям максимальной силы (f_m), времени, в который она достигается (t_m), нормированных максимальных скоростей фаз сокращения (V_{nc}) и расслабления (V_{nr}) массивы данных сравнивали с использованием парного t-критерия.

Было установлено, что во всех случаях (n = 13) действие МП сопровождается угнетением K^+-индуцированных сокращений (всреднем на 23%, P <0,001), а f_m с (12,9 ± 1,7) мН в контроле снижалась до (9,9 ± 1,5) мН на фоне МП (см. рис). Также действие МП вызывало достоверное увеличение времени t_m (0,36 ± 0,04 мин. и 0,41 ± 0,05 мин. в контроле и на фоне МП соответственно, P <0,05), которое, однако не отразилось на V_{nc}. Помимо изменения амплитудных характеристик ГКС, имело место относительное замедление расслабления препаратов: V_{nr} уменьшалась на 32,5% (P <0,01). Последующее повторение экспериментов на этих же гладкомышечных препаратах при выключении МП и его повторном действии выявило расслоение эффектов: в 4 препаратах f_m восстановилось до контрольного значения, в 5 препаратах - имело тенденции к восстановлению или осталось на уровне эффекта МП, и еще 4 препаратах наблюдалось дальнейшее снижение силы сокращения. Повторное действие МП вызывало достоверное снижение f_m.

Сокращения, индуцированные ацетилхолином, оказались менее чувствительными к действию МП. При действии данного фактора существенное снижение f_m (на 15% и более) было зарегистрировано на половине гладкомышечных препаратов (6 из 13). Тем не менее, статистический анализ всего массива данных позволил выявить достоверное уменьшение f_m на 11% (P = 0,036, n = 11) относительно контрольных значений. Остальные механокинетические показатели ацетилхолин-индуцированных сокращений (t_m, V_{nc} и V_{nr}) оставались на уровне контрольных значений.

Таким образом, результаты наших экспериментов показывают, что слабые МП способны влиять на сократительную активность гладких мышц кишечника, вероятно, за счет изменения эффективности электромеханического сопряжения возбуждения-сокращения.

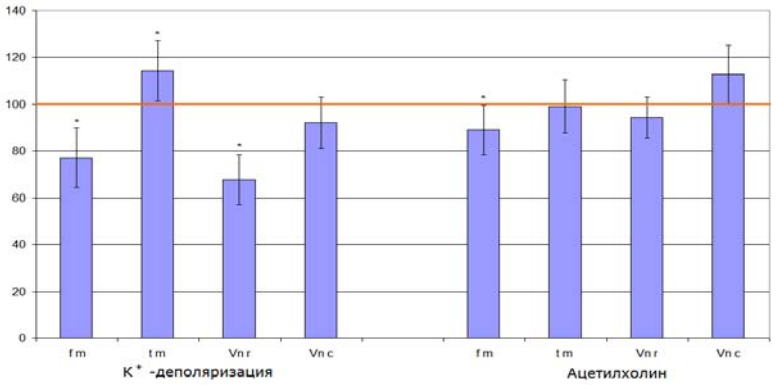


Рис. Влияние МП на механокинетические параметры сокращений гладкомышечных полосок caecum крысы.
Примечание: Данные представлены в процентах относительно контрольных значений, принятых за 100%; * - достоверные отличия параметров (P <0,05, парный критерий Стьюдента)

Литература:

1. *Мартынюк В.С., Абу Хада Р.Х., Ибрагимова Н.Д.* Реакция тучных клеток на действие хромогликата натрия и переменного магнитного поля в условиях in vitro // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И.Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2001. – Т.14 (53), № 3 – С. 117-120.
2. *Harland D.J., Liburdy R.P.* Environmental Magnetic Fields Inhibit the Antiproliferative Action of Tamoxifen and Melatonin in a Human Breast Cancer Cell Line // Bioelectromagnetics. – 1997. – Vol. 18. – P. 555–562.
3. *Burdyga Th.V., Kosterin S.A.* Kinetic analysis of smooth muscle relaxation // Gen. Physiol. Biophys. 1991. №10. P. 589–598.

EXTREMELY LOW FREQUENCY WEAK MAGNETIC FIELD INHIBITS CAUSED BY K +-DEPOLARIZATION AND ACETYLCHOLINE CONTRACTILE ACTIVITY OF SMOOTH MUSCLES

Tsymbalyuk O.V., Martyniuk V.S.

ESC «Institute of Biology» of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine
e-mail: otsymbal@bigmir.net; mavis@science-center.net

Currently, the biological activity of electromagnetic fields of extremely low frequency range is well known. One of the possible primary mechanisms of action of this factor may be associated with modulation of the activity of different systems of inter- and intracellular regulation. One of the manifestation of such action may be the phenomena of arising or decreasing of biological activity of different substances of natural and synthetic origin [1,2].

Using tensometric method for the isometric mode the induced by acetylcholine and high-potassium solution contractions of circular smooth muscle strips of rat caecum was investigated under the influence of an alternating magnetic field (MF) with a frequency of 8 Hz induction of 25 μT. Efficiency of electricity and pharmacomechanical coupling under these conditions was determined by recording the contractions induced by K^+-depolarization (HPC, 80 mM) and acetylcholine (ACh, 10 μM). Kinetics of the contractile responses were analyzed using Burdyga's and Kosterin's method [3] that provides the calculation of amplitude-independent the normalized maximum rates of individual phases of contraction and relaxation. All contractions were characterized by indices of the maximum force (f_m), the time at which it is achieved (t_m), the normalized maximal velocity phase contraction (V_{nc}) and relaxation (V_{nr}) data sets were compared using paired t-test.

It was found that in all cases (n = 13) the effect of MF is accompanied by inhibition of K^+-induced contractions (23%, P <0.001), and f_m (12,9 ± 1,7) mN in the control was decreased to (9,9 ± 1,5) mN upon action of magnetic field (see figure). The MF action caused a significant increase t_m (from 0,36±0,04 min in control to 0,41±0,05 min upon MF P<0,05) and was not reflected in V_{nc}. In addition to changing the amplitude characteristics of HPC, there has been relatively slow relaxation of smooth muscles: V_{nr} decreased by 32,5% (P <0,01). The subsequent repetition of the experiments on the same smooth muscle preparations, when we turn-off and turn-on the MF again, showed a bundle of effects: f_m restored to control values in 4 samples; there was a tendency to recovery in 5 of the samples or remained at the level of the after-effect of MF; the further decline of contractile force in 4 samples. Repeated action of MF caused a statistically significant decrease of f_m.

The contraction induced by acetylcholine were less sensitive to the action of a magnetic field. The significant reduction f_m (15% or more) were recorded under the action of this factor for 50% of smooth muscle samples (6 of 13). Nevertheless, the statistical analysis of array data revealed a significant decrease of f_m by 11% (P =0,036, n=11) relatively to control values. The other mechanokinetic indices of acetylcholine-induced contractions (t_m, V_{nc} and V_{nr}) remained at control levels.

Thus, the results of our experiments show that the weak magnetic field can affect the contractile activity of intestinal smooth muscles, probably due to changes in the efficiency of the electromechanical coupling of excitation-contraction.

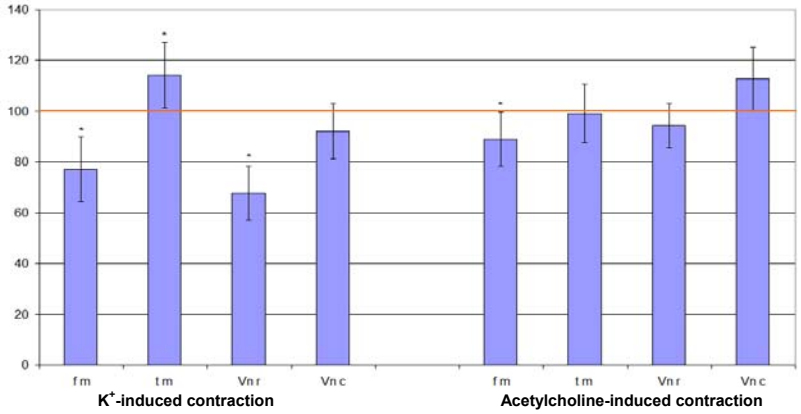


Fig. The influence of MF on the mechanokinetical parameters of contractions of rat caecum smooth muscles
Notes: The data presented in % relative to control values that was accepted as 100%, * - statistically significant differences by pair t-test (P<0.05)

References:

1. *Martynyuk V.S., Abu Hada A.D., Ibragimova N.D.* The reactions of mast cells on sodium chromoglycate and alternating magnetic field in *in vitro* // Uchenye University. VI Vernadsky. A series of "Biology, Chemistry. - 2001. - Vol.14 (53), № 3 - P. 117-120.
2. *Harland D.J., Liburdy R.P.* Environmental Magnetic Fields Inhibit the Antiproliferative Action of Tamoxifen and Melatonin in a Human Breast Cancer Cell Line // Bioelectromagnetics. – 1997. – Vol. 18. – P. 555–562.
3. *Burdyga Th.V., Kosterin S.A.* Kinetic analysis of smooth muscle relaxation // Gen. Physiol. Biophys. 1991. №10. P. 589–598.

АКТИВАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ С ПОМОЩЬЮ КОМБИНИРОВАННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ

[1]Шейкина Н.В., [2]Богатина Н.И.

[1] Физико-технический институт низких температур НАН Украины, Харьков, Украина
e-mail: bogatina@ilt. kharkov.ua; n_bogatina@ rambler.ru
[2]Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина
e-mail: sheykina@ukr.net

Развитие нового направления в науке – нанотехнологий привело к большому скачку в области применения лекарственных препаратов. Большое развитие сейчас получает гомеопатия. Особый интерес при этом возникает при изучении реакции биологического объекта на нанодозу биологически активного вещества.

Изменение наноконцентрации биологически активного вещества возможно и при слабом энергетическом воздействии. Например, слабое магнитное поле может очень слабо изменить концентрацию ионов, ориентированных вдоль поля, что может, по аналогии со сказанным выше, привести к аналогичным биологическим эффектам. Простые численные оценки дают порог воздействия магнитного поля на уровне на два порядка ниже геомагнитного поля.

Представленная работа – это поисковая работа, направленная на установления наличия или отсутствия аналогии в действии комбинированного магнитного поля и малых доз биологически активного вещества, возможности замены действия одного фактора действием другого и возможности применения более малых доз биологически активных веществ.

В настоящей работе изучалось действие двух биологически активных веществ – 0.01 мк молярного раствора нафтилфталамовой кислоты и 0.001 мк молярного раствора цитохалазина на гравитропическую реакцию корней кресс-салата. Показано, что основное действие раствора нафтилфталамовой кислоты – это угнетение гравитропической реакции после 6 часового проращивания в нем. Двух и трех- часовая выдержка в таком растворе приводит к незначительному замедлению гоавитропической реакции. Аналогичного 6 часовой выдержке в растворе нафтил-фталамовой кислоты угнетения удалось добиться при воздействии на корни кресс-салата, проращиваемые в водном растворе нафтил-фталамовой кислоты в течение 15 минут, комбинированным магнитным полем, переменная составляющая которого формально совпадала с циклотронной частотой ионов нафтилфталамовой кислоты. Это указывает на активацию действия ионов нафтилфталамовой кислоты комбинированным магнитным полем. Аналогичные результаты были получены для цитохалазина и других ингибиторов.

ACTIVATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUND NANODOSE BY COMBINED MAGNETIC FIELD

[1]Sheykina N.V. [2]Bogatina N.I.

National University of Pharmacy, Kharkov, Ukraine
e-mail: sheykina@ukr.net
B. Verkin Institute for Low Temperature Physics & Engineering, Kharkov, Ukraine
e-mail: n_bogatina@rambler.ru

The new science direction – nanotechnologies initiated a big jump in the pharmacology and region of using of medicines. This leads to the big development of homeopathy. The most interest appeared while investigating of the reaction of biological object on the nanodose of biologically active subject.

The changing of concentration (in nmol/l) of biologically active material is also possible during weak energy action. For instance, weak combined magnetic field may change a little the cconcentration of ions that are oriented parallel to the external magnetic field and by the analogy with said above lead to the analogous effects. Simple estimations give the value for the threshold to the magnetic field by two orders smaller than the geomagnetic field.

The work is the work in that we want to understand whether the analogy in the action of small (nano) dose of biologically active material and weak combined magnetic field presents or not and whether the action of one of these factors may be changed by other one.

The effect of one of biologically active substances NPA (Naphtyl- Phtalamic Acid) water solution with the concentration 0.01 μmol/l and 0.001 μmol/l of cytokhalazine on the gravitropic reaction of cress roots was investigated. It was shown that 6 hour treatment in the solution of NPA leads to inhibition of cress roots gravitropic reaction. 32, 3 and 4 hours treatment in this solution didn't essentially decrease the gravitropic reaction. The same inhibition (6 hours in NPA solution) was achieved by the combined magnetic field action on the cress roots, germinated in water solution of NPA during 15 minutes. The alternative component of the combined magnetic field coincided formally with the cyclotron frequency of NPA ions. It indicates on the activation on the NPA ions by combined magnetic field. Analogical results were obtained for cytohalazine and other inhibitors.

ON FARMACOELECTRODYNAMICS:FROM DRUG INTOLERANCE TO A SEP (SKIN ELECTRIC PARAMETERS) DRIVEN THERAPY

Vincenzo Valenzi, Albina Pisani, Aldo Calandri, Pasquale Avino

ISREP/LIUM, Bellinzona, Switzerland
e-mail: vincenzo.valenzi@lium.ch

The magic bullet. A fundamental progress for understanding the relationship between a drug and the cell components has been achieved when the concept of "drug receptor" has been formulated. Paul Ehrlich (1845-1915) deserves the merit of having the insight that the effect of drugs could be understood against as the consequence of their chemical interaction with the tissue. Then he stood against the "vitalistic" approach, still deeply rooted in the early years of the century; the basic tenet of "vitalism" was that the effectiveness and specificity of drug could not arise from the laws of physics and chemistry, but would require the active presence of some supposed "vital forces", Ehrlich (3), on the contrary, stressed that, to be effective, the molecular components of a drug should "bind" to some specific component of the cell. He defined accordingly the receptors as "the active group of molecule of the protoplasm where it is possible to bind a corresponding chemical group of a molecule not belonging to the protoplasm>> . To better explain this concept he proposed the suggestive definition of a <<magic bullet>> able to hit its specific target (the "receptor") in the crowd of chemical components of the living organism.

Actual problems and controversial on drug intolerance. However the "magic bullet" is not always able to get the target. Frequently, in spite of the ceaseless progresses of pharmacology, adverse and intolerance against the drugs may occur and produce situations where a careful evaluation of the risk/benefit ratio of the use of the drug is mandatory. A fraction as the 70/75% of the disease induced by drugs cannot admit any explanation in terms of the usual immunological reactions, although those symptoms were induced by drugs which were well known allergens. In these cases the disease has been christened as "pseudo-allergy" or drug intolerance. The drugs which elicit largest pseudo-allergic response are the antinflammation non steroid ones, some antibiotics, the local anaesthetics etc.

The most frequent symptoms are quite similar to exhibited by "real" allergic reactions, but less intense and acute. In the "real" allergies the typical diagnostic probes are the skin reactions, the nose and mouth stimulation tests, the measurement of the specific IgE (Rast), the "in vitro" lymphocitary blastization and others.

In the last 13 years, Dr Umberto Grieco has made us familiar with the experiences of the Voll Electroacupunture, that have achieved surprising successes in the diagnosis of the food and drug intolerance. After many exchanges with Umberto and a number of tests a the Centre of Immuno-allergology led by prof. Franco Filiaci, we were convinced that a controlled investigation was useful with the aim of checking these surprising phenomena.

In a nutshell, the appearance of electric voltage on the skin suggested that an electromagnetic (e.m.) mechanism could underlie these strange pseudo-allergies; since these symptoms were the effects of drug, the intriguing possibility arose that the molecules of drugs could extrinsecate an e.m. action apart from the universally accepted chemical action. In order to probe this possibility, in April '99 of a wide-range research program, run by the Surgeon Department of the University of Rome "La Sapienza", on a population of patients provided by Italian Treasury Police (Guardia di Finanza).

The object of the research is the systematic measurement of the skin electric parameters and the search for correlation's with the existence of food and drug intolerance. In the first experiments an EAV-Voll Electric acupunctures (5-6) equipment has been used. This equipment measures the electric conductance in the body along paths which coincide with the meridians as recognised by Chinese acupunture. Notice that the present understanding of the skin electrophysiological effects does not yet allow a satisfactory modelling of the phenomenon and , furthermore, the instrumentations, which is produced mainly in Germany, is not yet so reliable to guarantee a complete reproducibility of the tests. It in thus mandatory to correlate the EAV data with the usual clinical and diagnostic results.

Outlook of the research. The pilot study program has involved so far more than 250 volunteers and the crossing of the EAV and clinical evidence has opened a new horizon to the drug therapies.The preliminary results, to be checked further with double blind tests, show a dramatic improvement of the risk/benefit ratio by the avoidance of the drugs which exhibit lowering of these adverse reactions by a skilful use of the EAV techniques. The main problems to decipher the physics dynamics of this interplay between chemical drugs and the body electric conductance. We have observed how drug and food introductions in biological system, can increase or decrease the coherence of the system. Analogous to what occurs in super conductive materials (see volume "From quark to crystals" of Giuliano Preparata) an increase of coherence is associated to phenomenon of high conductance. It is in this way that we observe that an efficient drug, produces in the electrical circuit of the human body, an increase of conductance of approximately 30/70%, that is correlated to an increase of energetic power provable with "chinesiological" tests and impressionable clinical improvements. This is the rationale on the possible role of Quantum ElectroDynamics (QED) in Medicine. We have asked Giuliano Preparata and Emilio Del Giudice in order they help us to understand by the QED mechanism how drugs could show an action -at- a-distance, which should underlie the body electric phenomena and open new ways to the drug electrodynamics. In these last ten years many observation was confirmed in many free test. It will be useful develop the theoretical and experimental research to verifier this essential innovation for drug therapy and for a rationale use of wonderful instruments for life that are the drug.

Refences:

1. *V. I Valenzi, B. Messina* Procedings meeting on: The role of quantum electro dinamycs in medicine. Rivista di Biologia/Biology Forum 93 (2000) pp. 267-312. http://web.tiscali.it/numedi/arc2002/0902/12.html

ВЛИЯНИЕ НАЛОКСОНА НА НОЦИЦЕПЦИЮ МОЛЛЮСКОВ *HELIX ALBESCENS*, ПОДВЕРГНУТЫХ ДЕЙСТВИЮ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭМИ КВЧ

Темурьянц Н.А., Чуян Е.Н., Туманянц К.Н., Костюк А.С.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина
e-mail: alexkostyuk@mail.ru

Исследовано влияние ЭМИ КВЧ частотой 42,2ГГц ППМ 10 мВт/см^2 при многократном (30´ в день в течение 21 суток) изменяет ноцицепцию моллюсков, изменения носят фазный характер: первая кратковременная (первые-третьи сутки) фаза гипераналгезии сменяется стадией снижения ноцицепции, то есть развитием гипоаналгетического эффекта, который достигает максимума на 16 сутки, а затем снижается до исходного уровня. Начальное увеличение чувствительности к термическому стимулу под влиянием ЭМИ КВЧ обнаружено нами впервые. Как свидетельствуют данные литературы (Prato et. al., 2000; Del Seppia et. al., 2005) и результаты собственных ранее проведенных исследований (Темурьянц и др., 2010; Костюк и др., 2009), ЭМИ и других частотных диапазонов после первых воздействий вызывают гипераналгетический эффект. Наиболее ярко этот эффект выражен при электромагнитном экранировании (Костюк и др., 2009). Этой стадии при воздействии ЭМИ КВЧ, по-видимому, соответствует обострение болевого синдрома, имеющего место при КВЧ-терапии. Кроме того, обращает на себя внимание быстрое и стойкое повышение антиноцицептивного действия ЭМИ КВЧ, которое, впрочем, снижается при увеличении числа воздействий.

Как показали проведенные исследования у моллюсков, которым перед каждым воздействием ЭМИ КВЧ вводили неселективный блокатор опиоидных рецепторов налоксон, отмечены фазные изменения ноцицепции, но эти изменения были гораздо менее выражены по сравнению с таковыми вызываемыми только ЭМИ КВЧ.

Обнаружено, что опиоидная система участвует в развитии аналгетического эффекта ЭМИ КВЧ. На разных этапах его продолжительного действия роль этой системы неодинакова: в течение первых-третьих суток ее активность несколько снижена, что, по-видимому, является одной из причин обнаруженной нами гипераналгезии, с четвертых по восьмые сутки гипоаналгетический эффект ЭМИ КВЧ полностью блокируется налоксоном, то есть обусловлен только опиоидами, с 15 дня этот эффект редуцируется, но не аннулируется неспецифическим блокатором опиоидных рецепторов, то есть является лишь частично опиоидобусловленным. Роль опиоидов уменьшается с увеличением числа воздействий, что связано с развитием толерантности опиоидной системы к действию ЭМИ КВЧ. Такой эффект обнаружен нами при длительном воздействии ЭМИ КВЧ впервые.

Литература:

1. *F.S. Prato, M. Kavaliers, A.W. Thomas* Extremely low frequency magnetic fields can either increase or decrease analgaesia in the land snail depending on field and light conditions // Bioelectromagnetics. – 2000. – Vol. 21. – P. 287–301.
2. *C. Del Seppia, P. Luschi, S. Ghione [et al.* Exposure to a hypogeomagnetic field or to oscillating magnetic fields similarly reduce stress-induced analgesia in C57 male mice // Life Sci. – 2000. – Vol. 66 (14). – P. 1299–1306.
3. *Н.А. Темурьянц, А.С. Костюк, К.Н. Туманянц* Динамика и инфрадианная ритмика температурной/болевой чувствительности моллюска *Helix* в условиях воздействия электромагнитных полей // Нейрофизиология / Neurophysiology. – 2010. – Т. 42, № 4. – С. 329–339.
4. *А.С. Костюк, Н.А. Темурьянц* Динамика и инфрадианная ритмика болевой чувствительности моллюсков *Helix albescens* при электромагнитном экранировании // Труды IX ежегодной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы "Биохимическая физика" – Москва, 9-11 ноября 2009. – С. 115–121.

Фундаментальные и прикладные аспекты применения биологически активных веществ: сельское хозяйство

Fundamental and Applied Problems of Application of Bioactive Substances: Agriculture

Спонсор Конференции

BIO-RAD

BIO-RAD Laboratories

Обладнання і реагенти для дослідницьких, медичних та промислових лабораторій

Компанія BIO-RAD (США) є найбільшим світовим виробником лабораторного та аналітичного обладнання. На сьогодні BIO-RAD представляє широку гамму обладнання для дослідницьких та промислових лабораторій:

- **ПЛР-ампліфікатори CFX96 Real Time**
- **Обладнання та реагенти для геном них та протеомних досліджень**
- **Обладнання для рідинної хроматографії**
- **Обладнання, реагенти і витратні матеріали для електрофорезу та блоттінгу**
- **Системи анализу зображення. Документуючі системи. Програмне забеспечення**

За додатковою інформацією щодо технічних можливостей та вартості продукції компанії BIO-RAD просимо Вас звертатися до регіонального представництва компанії в Україні за адресою:

Київ, 02160, проспект Возз'єднання 7а, оф. 315
Тел.: (050) 446-21-13, (050) 448-34-56
e-mail: office@bio-rad.com.ua
www.bio-rad.com

ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТА ФЕНОЗАН НА ВЫДЕЛЕНИЕ ЭТИЛЕНА И СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВОГО ИНГИБИТОРА ПОЛИГАЛАКТУРОНАЗЫ В ПЛОДАХ ЯБЛОНИ

[1]Буланцева Е.А., [1]Ружицкий А.О., [2]Серебряный А.М., [1]Проценко М.А., [1]Кораблева Н.П.

[1] Учреждение Российской Академии Наук Институт биохимии им.А.Н.Баха, Москва, Россия
e-mail: protsenko@inbi.ras.ru
[2] Учреждение Российской Академии Наук Институт биохимической физики им.Н.М.Эмануэля
Москва, Россия

Изучение действия синтетических регуляторов роста на плоды яблони помогает понять механизмы регуляции жизнедеятельности плодов и продлить сроки их хранения.

Препарат фенозан (β-3,5-дитрет-бутил-4-оксифенил-пропионовая кислота) – синтезирован в России. Изучали способность фенозана оказывать влияние на созревание плодов яблони, выделение этилена и изменение активности белкового ингибитора полигалактуроназы (БИПГ) в плодах. В период послеуборочного хранения плод продолжает свое существование в автономном режиме. При этом в тканях плода происходят биосинтетические процессы, приводящие в частности, к выделению этилена, рассматриваемого в качестве гормона созревания. Наибольшее количество этилена выделяется плодами в стадии физиологической зрелости. В процессе старения выделение этилена постепенно уменьшается. Определение выделения этилена плодами проводили методом газовой хроматографии. Пробы газа вводили в газовый хроматограф GC 2010 с масс-спектрометрическим детектором GCMS QP 2010 (Япония). Колонка капиллярная MDN-1(связанный неполярный метилсиликон) длиной 30 м, диаметром 0,32 мм. Газ-носитель гелий. Режим деления потока 1:25, скорость потока по колонке 1,8 мл/мин. Температуры: колонки – изотермический режим 40° С, инжектора – 120° С, детектора – 200° С. Этилен определяли по времени выхода.

Обработка фенозаном целых плодов яблони сортов Симиренко и Мантуанское вызывала уменьшение выделения этилена в первую неделю измерений (на 5, 11 и 16% у сорта Симиренко и на 4, 12 и 19% у сорта Мантуанское), затем выделение этилена постепенно возрастало и к концу срока наблюдений достигло уровня контроля. Диски из плодов яблони обработанные фенозаном в модельных опытах, при каждом последующем измерении выделяли меньше этилена, и его количество было меньше чем в контроле до последнего дня измерений.

Одновременно при созревании происходит размягчение плодов, обусловленное действием фермента полигалактуроназы (ПГ – PG-poly-[1,4-α-D-galacturonide]glycanohydrolase; KF 3.2.1.15), который расщепляет гликозидные связи около свободных карбоксильных групп в молекуле пектина, обеспечивающего прочность клеточных стенок и связь между ними. В плодах многих растений обнаружен БИПГ, который способен снижать активность ПГ. В незрелых плодах его содержание достаточно высоко, оно снижается по мере созревания и несколько повышается во время послеуборочного хранения. Содержание БИПГ в целых плодах яблони в процессе хранения изменялось по-разному в зависимости от сорта. Его максимум проявлялся несколько позднее у позднеспелого сорта Мантуанское. Действие фенозана приводило к снижению накопления БИПГ именно в период его повышения в контроле.

Изучение механизма действия фенозана позволит разработать биотехнологию оптимизации процесса хранения плодов.

THE EFFECT OF PHENOSAN PREPARATION ON THE ETHYLENE PRODUCTION AND THE CONTENT OF POLYGALACTURONASE INHIBITING PROTEIN IN APPLE FRUITS

[1] Bulantseva E. A., [1] Ruzhitsky A. O., [2] Serebryany A. M., [1] Protsenko M. A., [1] Korableva N. P.

[1] A.N.Bach Institute of Biochemistry RAS
Moscow, Russia
e-mail: protsenko@inbi.ras.ru
[2] N.M Emmanuel Institute of Biochemical Physics RAS
Moscow, Russia

The investigation of the effect of synthetic growth regulators on apple fruits is of grate interest for deeper inside in the controlling of ripening process and to prolong storage period.

Phenosan (β-3,5-ditret-butyl-4-oxyphenyl-propionic acid) was syntesed in Russia. The capability of phenosan to influence on apple fruit ripening, ethylene production and change of the activity of polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) in fruits was studied. After harvesting the fruit continue to live independently from maternal tree. The biosynthetic processes occur in fruit tissues that lead to the production of ethylene – “hormone of ripening”. The most amount of ethylene is produced by fruits at climacteric stage of ripening and gradually decreases at postclimacteric stage. Ethylene was determined by gas chromatography. The gas sample was injected into the gas chromatograph GC 2010 equipped with mass spectrometer detector GCMS QP 2010 (Shimadzu, Japan). The capillary column MDN 1 (bound nonpolar microsilicone) of 30 m length and 0.32 mm diameter was used with helium as the carrier gas, 1 : 25 flow splitting regime and the column flow rate 1.8 ml/min. Temperature regimes were as follows: column – isothermal regime 40°C, injector – 120°C, detector – 200°C.

The treatment of Simirenko and Mantuansky whole apple fruits by phenosan decreased ethylene production in the first week of detection (by 5, 11 and 16% for Simirenko apple fruits and by 4, 12 and 19% for Mantuansky apple fruits). The production of ethylene gradually increased later, and achieved the control level by the end of the experiment. The production of ethylene by discs of apple fruits treated by phenosan was less as compared with control during the experiment.

The softening of fruit tissue occurs at apple fruits ripening caused by polygalacturonase (PG – poly-[1,4-α-D-galacturonide]glycanohydrolases; KF 3.2.1.15) action. PG cleaves glycoside bonds near free carboxylic group in pectin molecule that ensure the firmness of cell walls and connection between them. PGIP was detected in the soft fruits of many plants that decrease PG activity. The activity of PGIP in unripe fruits is high but lowers during ripening and some increase at after harvesting storage. In our experiments, the activity of PGIP in whole apple fruits varied differently depending of variety. The peak of activity was detected some later in Mantuansky than in Simirenko. The effect of phenosan caused the lowering of PGIP activity at the time when it increased in control fruits.

The investigation of mechanism of phenosan effect allows developing the biotechnology for optimization of the fruit storage process.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ БРАССИНОСТЕРОИДОВ ИЗ ПРИРОДНОГО СЫРЬЯ КАК ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ БИОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СИСТЕМ

Драговоз И.В., Курчий Б.А.

Институт физиологии растений и генетики, Киев, Украина
e-mail: igordragovoz@ukr.net; kurchii@mail.ru

:

Сельскохозяйственные растения постоянно подвержены экологическим стрессам (грибные и микробные фитопатогены, абиотические факторы). Инфекционный стресс и абиотические факторы часто превышают порог возможности их адаптации. В этой связи весьма актуальным является разработка различных методов иммунокорекции для эффективного контроля иммуноответа на повреждающее действие растений различными агентами. В течение эволюции у растений сформировались природные защитные системы, контролируемые различными биогенными факторами. Среди них брассиностероиды, в частности 24-эпибрассинолид, биологическое действие которых наблюдается в нано- и пико-концентрациях, представляют наибольший интерес.

В наших исследованиях изучалась возможность предотвращения действия стрессовых факторов среды (низкая и высокая температуры, засуха и фитопатогены) на растения озимой пшеницы иммуномодуляторами природного происхождения. Брассиностероиды получали из грибов (микомицеты *Acremonium* и *Chaethomium*) культивируемых in vitro с последующей стандартизацией препаратов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Действие 24-эпибрассинолида было изучено в комбинации из микроэлементами и другими соединениями природного происхождения (холестерол, эргостерол, зеатин, ауксины, гиббереллoвая и абсцизовая кислоты).

Результаты лабораторных, вегетационных и полевых опытов свидетельствуют о положительном действии этих веществ (в нано- и микро-концентрациях) на рост и формирование устойчивости к фитопатогенам растений озимой пшеницы. Этот комплексный препарат был особенно эффективным против фитопатогенов Fusarium spp., Oculimacula spp., and Ophiobolus spp. на растениях озимой пшеницы в полевых условиях. В лабораторных условиях обработка растений препаратом вызывала уменьшение заболевания церкоспореллезом на 18-20%. Это может свидетельствовать как о прямом (биоцидном) действии препарата на фитопатогены, так и об индукции фитоиммунитета растений.

Полученные данные представляют теоретический интерес для формирования нового направления в практике защиты растений – создание биопрепаратов, индуцирующих фитоиммунитет, в частности, к грибным патогенам.

EFFECTIVENESS OF BRASSINOSTEROIDS FROM NATURAL MATERIALS AS IMMUNOMODULATORS OF BIOFUNCTIONAL SYSTEMS

Dragovoz I.V., Kurchii B.A.

Institute of Plant Physiology and Genetics, Kiev, Ukraine
e-mail: igordragovoz@ukr.net; kurchii@mail.ru

Agricultural plants are permanently exposed to ecological stresses (diseases, pests, abiotic factors). Infectious stress and abiotic factors exceed sometimes their threshold adaptation. In this connection the elaboration of diverse methods of immunocorrection to effectively control of plant immunoresponses to damage by diverse agents is very relevant. During evolution in the plants were formed the natural defense systems which are controlled by diverse biogenic factors. Among them brassinosteroids are of the greatest interest, especially 24-epibrassinolide, which biological effects can be visible at nano- and pico-concentration. In our work we studied the possibility to prevent the action of environmental stress factors (low and high temperature, drought and phytopathogene infection) on the winter wheat plants with immunomodulator of nature origin. The brassinosteroids were derived from fungi (mycomycetes *Acremonium* and *Chaethomium*) cultivated in vitro with next standardization of preparations by HPLC chromatograph. The action of 24-epibrassinolide was investigated in combination with microelements and another natural substances (cholesterol, ergosterol, zeatin, auxins, gibberrellic acid and abscisic acid).

The results of laboratory and greenhouse studies, and also field experiments suggest on the positive effects of these substances (at nano and micro concentrations) on the growth and development and the resistance of winter wheat plants to phytopathogenes. This multi-compound preparation was especially effective against phytopathogenes such as Fusarium spp., Oculimacula spp., and Ophiobolus spp. at the plants in the field conditions. In the laboratory conditions the winter wheat plants treated with this preparation resulted in the decreasing of Cercosporella herpotrychoides infection up to 18-20%. This may suggest as direct (biocide) action on the phytopathogenes as an induction of phytoimmunity of plants.

The received data present a theoretical interest for development of new perspective trends in the phytopathology – the creation of biopreparations that induce phytoimmunity, especially to phytopatogenes.

ГОРМОНСИНТЕЗИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

[1]Драговоз И.В., [2]Леонова Н.О., [2]Белявская Л.А.

[1]Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: igordragovoz@ukr.net
[2]Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: natikleo@online.ua

В современном земледелии для повышения симбиотического потенциала микробно-растительных систем актуальным является создание биопрепаратов на основе высокоэффективных штаммов почвенных микроорганизмов, обладающих широким спектром активности. Целью работы было исследование гормонсинтезирующих способностей некоторых свободноживущих и симбиотических диазотрофов в условиях *in vitro,* а также оценка содержания и состава синтезированных фитогормонов. В качестве объектов использовали штаммы почвенных ризосферных микроорганизмов *Azotobacter chroococcum* и *Bradyrhizobium japonicum* из коллекции Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины.

Полученные результаты показали достаточно низкий уровень или полное отсутствие фитогормонов классов ауксинов и цитокининов в биомассе исследованных штаммов свободноживущих диазотрофов рода *Azotobacter*. Параллельно с определением фитогормонов в биомассе бактерий был проведен анализ способности микроорганизмов продуцировать эти соединения как экзометаболиты в культуральную среду. Следует отметить, что высокой способностью к синтезу ауксинов и цитокининов характеризовались симбиотические штаммы сои *B. japonicum*.

Таким образом, высокая биологическая активность исследованных штаммов свободноживущих и симбиотических азотфиксирующих бактерий, по-видимому, в значительной степени связана с их высокой способностью к синтезу гормонов ауксинового и цитокининового типов, которая является одним из механизмов адаптации почвенных микроорганизмов к условиям окружающей среды. Делается вывод, что культуральные жидкости исследованных штаммов почвенных микроорганизмов (родов *Bradyrhizobium* и *Azotobacter*) можно использовать для создания композиционных препаратов, обладающих ростстимулирующей активностью.

HORMONE-SYNTHESISING ACTIVITY OF SOME SOIL MICROORGANISMS *IN VITRO*

Dragovoz I.V.,[1] Leonova N.O.,[2] Biliavska L.O.

[1]Institute of Plant Physiology and Genetics of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: igordragovoz@ukr.net
[2]Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: natikleo@online.ua

In conditions of modern agriculture to increase the symbiotic potential of plant-microbial systems is urgent creation of composite products based on highly efficient strains of soil microorganisms that have a wide range of biological activity. The question is whether there is a difference in the synthesis of phytohormones in the symbiotic and free-living microorganisms due to their effectiveness fixing atmospheric nitrogen.

The goal of our research was to study the phytohormone production ability of some free-living and symbiotic diazotrophs *in vitro* and physicochemical methods to assess qualitative and quantitative composite of the synthesized phytohormones.

The objects for research were soil rhizosphere microorganisms *Azotobacter chroococcum* and *Bradyrhizobium japonicum* from the collection of the Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine. Detection of phytohormones was performed in biomass and culture media investigated microorganisms.

The results showed very low (or sometimes complete absence) of auxins and cytokinins in the biomass and in the free-living diazotrophs *Azotobacter* strains.

Although the cytokinin content in the biomass of soil microorganisms was small, it should be noted that the ability of all strains produced zeatin-rybozide (transport form of cytokinins), which probably has a physiological relevance when interacting with plant host.

At the same time accumulation of phytohormones in the bacterial biomass was accompanied by the ability of microorganisms to produce these compounds as exometabolites in the culture medium. It should be noted that very high capacity for the synthesis of auxins and cytokinins characterized symbiotic strains of the genus *Bradyrhizobium*, including soybean rhizobia. Also, all investigated organisms were able to produce gibberellins in the culture medium, but last compared with auxins and cytokinins were present in small quantities.

Thus, the high biological activity of investigated strains and free-living nitrogen-fixing symbiotic bacteria in our opinion, may caused by increased ability for the synthesis of hormones such as auxins and cytokinins, and can be viewed as one of the mechanisms of soil microorganisms adaptation to environmental conditions. It should also be emphasized that phytohormone compounds play an important role in the exchange of metabolic products between plants and bacteria that positively affect the growth of plants from one hand (due to changes in the pool and the ratio of auxins and cytokinins in plant tissues) and colonization rhizosphere by soil microorganisms, on the other. It is concluded that in vitro culture soil microorganisms (generally *Bradyrhizobium* and *Azotobacter*) can be used to create composite products that combine the ability of crops to nitrogen fixation and simultaneously have properties of plant growth regulators.

ВИКОРИСТАННЯ ГРИБНИХ ЕКСТРАКТІВ В ЯКОСТІ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ

Жук О.І., Маковейчук Т.І.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ, Україна
e-mail : zhuk_bas@voliacable.com

Реалізацію потенційної продуктивності сучасних продовольчих культур обмежують запаси доступної води, температура, ураження шкідниками і хворобами [2]. З метою зменшення негативної дії на рослини стресових чинників біотичної та абіотичної природи широко використовують регулятори росту. Особливе значення надають цим агроприйомам при вирощуванні важливої продовольчої культури – озимої пшениці [1]. У сучасних агротехнологіях набули широкого використання регулятори росту, які створені на основі природної сировини. В якості джерел регуляторів росту та біологічно активних сполук використовують гриби роду Acremonium та виду Chaetomium cochliodes. На їх основі створено ряд комплексних препаратів широкого спектру дії, до яких належить препарат хетомік [3]. Поряд з препаратами, які містять лише грибні екстракти, використовують також препарати комплексного типу, до складу яких входять не лише компоненти грибкового походження

Метою наших досліджень було вивчення антистресової дії комплексу фізіологічно активних речовин грибкового походження, які входять до складу препаратів антистрес та хетомік. Об'єктами досліджень були сорти озимої м'якої пшениці Колумбія, Поліська 90, Володарка, Подолянка. Роботу проводили в умовах лабораторних та вегетаційних дослідів. В умовах лабораторних дослідів насіння озимої пшениці замочували в розчинах препаратів протягом 30-60 хвилин, пророщували на зволоженому фільтрувальному папері або в зволоженому піску протягом 7 діб.

В умовах лабораторних дослідів на прикладі озимої пшениці сортів Колумбія і Поліська 90 було встановлено, що допосівна обробка насіння водним розчином препарату антистрес в концентрації 22,5 мл/л зменшувала негативну дію високотемпературного стресу, який створювали прогрівом рослин при температурі 45 °С протягом 2 год., на 7 добові проростки і стимулювала ріст коренів у післястресовий період. Вивчення динаміки росту кореневої системи і листків проростків озимої пшениці дозволило з'ясувати, що у оброблених препаратом до пророщування зернівок швидкість відновлення коренів була більшою, ніж у рослин, які вирощували без попередньої обробки препаратом.

Допосівна обробка насіння озимої пшениці сортів Колумбія і Поліська 90 препаратом хетомік на основі екстракту з гриба Chaetomium cochliodes в концентрації 10^{-9} М також зменшувала дію високої температури (45 °С, 2 год.) на 7 добові проростки, що встановлено за допомогою вимірювання добових приростів рослин після дії стресу та наростання сирої маси пагонів і коренів. Більш значна ефективність препарату виявлена на приріст коренів порівняно з приростом коренів.

В серії лабораторних дослідів вивчали також вплив препарату хетомік в концентраціях 10^{-5}- 10^{-9}М на розвиток збудників фузаріозу, гельмінтоспоріозу, офіоболозу (Fusarium graminearum, Bipolaris sorokiniana, Galumannomyces graminis var.tritici) у проростків озимої пшениці сортів Колумбія і Поліська 90. Встановлено, що передпосівна обробка насіння озимої пшениці знижувала ураженість проростків на 10,7-30% збудниками грибів-некротрофів.

Вивчення дії препаратів антистрес та хетомік на формування продуктивності озимої пшениці в умовах вегетаційних дослідів дозволило встановити, що вони позитивно впливають на продуктивність рослин. Обробка рослин препаратом антистрес у фазі трубкування зменшувала негативну дію модельної посухи у фазі цвітіння-формування зерна на продуктивність озимої пшениці сорту Подолянка. Встановлено, що у оброблених рослин збільшувалась маса 1000 зерен. В умовах дефіциту води маса 1000 зерен у пшениці сорту Подолянка складала 27,0 г, а у оброблених рослин в умовах посухи складала 31,1 г. Відзначено також збільшення кількості зерен в колосі в умовах дефіциту води в грунті після обробки препаратом антистрес.

В окремому вегетаційному досліді було вивчено дію обробки рослин пшениці сортів Поліська 90 і Володарка препаратом хетомік на ступінь зараження рослин борошнистою росою. Встановлено, що комплекс грибного екстракту зменшував зараження листків рослин борошнистою росою на 20-30%. Зменшення зараження листків стабілізувало продуктивність рослин озимої пшениці в умовах оптимального забезпечення водою і елементами мінерального живлення. Одночасно відзначено зменшення розвитку кореневих гнилей, які спричиняє зараження грибами-некротрофами.

Таким чином, комплекси головних фітогормонів, фізіологічно активних речовин, які містяться в грибкових екстрактах, зменшували негативну дію стресових чинників абіотичної і біотичної природи і дозволяли підвищувати продуктивність сучасних сортів озимої пшениці в несприятливих умовах вирощування. Найбільш ефективними грибкові екстракти виявились в період проростання насіння, росту проростків. Важливу роль відіграють екстракти в зменшенні зараження кореневої системи рослин.

Література:

1. *Гульванський І.М., Синицький С.Л., Моспіан М.І.*Ефективність позакореневого підживлення та регуляторів росту у поліпшенні зерна пшениці озимої // Агроекологічний журнал.-2009.-№3.-С.59-63.
2. *Жук О.І.* Формування адаптивної відповіді рослин на дефіцит води //Физиология и биохимия культ.растений.-2011.-т.43,№1.- С.26-37.
3. *Яворська В.К., Драговоз І.В., Богданович А.В., Антонюк В.П.* Регулятори росту природного походження як засоби підвищення продуктивності сільськогосподарських культур //Физиология и биохимия культ.растений.—2008.-т.40,№4.–С.292-298.

APPLICATION OF FUNGAL EXTRACTS AS A GROWTH REGULATORS

Zhuk O.I., Makovejchuk T.I.

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: zhuk_bas@voliacable.com

Realization of potential productivity of modern food cultures is limited by resource of accessible water temperature, injury by pests and diseases [2]. Growth regulators are widely used for the decreasing negative influence of biotic and abiotic stress factors on plants. These agricultural methods have special significance under cultivation of such important food culture as winter wheat [1]. Growth regulators that are created on basis of nature materials are widely used in modern agro technologies. Fungi of genus Acremonium and Chaetomium cochliodes are used as sources for growth regulators and biological active compounds. Set of complex agents of wide action spectrum such as agent hetomik are based on their basis [3]. Along with agents that contain only mushroom extracts, they are also used complex type of agents, which include not only components of fungal origin. Essential parts of fungals extracts are phytohormones gibberellins, cytokinins, auxins, brassinosteroids, vitamins, antioxidants, enzymes. In addition, they contain elements of mineral nutrition, organic acids, and compounds with fungicidal action. Biological agents based on fungi-antagonists or extracts isolated from these are characterized by high efficiency with no pollution of environment. Study of physiological substances and complexes which are fungal origin, belonging to the actual problems of modern biology by the need to reduce the chemical load on the environment, facilitate recycling and using of agents. Despite considerable interest in the problems of physiologically active substances of natural origin much of its aspects is not studied.

The aim of our research was to study the antistress effect of physiologically active substances of fungal origin these are part of antistress agents and hetomik. Were investigated varieties of winter wheat Columbija, Poliska 90, Volodarka, Podolyanka. The work was made in laboratory and vegetation conditions of experiments. Under laboratory experiment conditions winter wheat seed was watered in the agent solutions for 30-60 minutes, couched on wet filter paper or moistened sand for 7 days.

Under conditions of laboratory experiments on the example of winter wheat varieties Columbija and Poliska 90 it was established that seed treatment before sowing by water solution of agent antistress in concentration 22.5 mg / l decreased the negative effect of high temperature stress, which was created by heating of plants at a temperature of 45 ° C for 2 hours, on 7-days seedlings and stimulated the growth of roots in after stress period. Studying the dynamics of the root system and winter wheat leaves allowed finding that the rate of recovery of roots in seeds treated by agent was greater than in plants grown without agent pretreatment.

Winter wheat varieties Columbija and Poliska 90 seed treatment before sowing of by hetomik agent based on extracts from the fungus Chaetomium cochliodes concentration of 9.10 M also decreased the action of high temperature (45 °C, 2 hr.) on 7-day seedlings that established by measuring daily increments after the action of plant stress and increase of wet weight of shoots and roots. More significant efficacy was found to increase root growth compared with roots.

In a series of laboratory experiments studied the effect of the agent concentrations in hetomik 10^{-5} - 10^{-9} M for the development of pathogens seedling blight of cereals, helmintosporioz, ofioboloz (Fusarium graminearum, Bipolaris sorokiniana, Galumannomyces graminis var.tritici) in seedlings of winter wheat varieties Columbija and Poliska 90. It is established that presowing seed treatment reduced the contamination of winter wheat seedlings at 10,7-30% by necrotrophs fungal pathogens.

The study of agents and antistress hetomik the formation of winter wheat productivity in vegetation experiments revealed that they positively affect plant productivity. Processing plants in the booting phase of agent Antistress decreased the negative effects of drought in a stage of flowering-seed formation on productivity of winter wheat variety Podolyanka. It is established that in treated plants weight of 1000 grain increased. Under conditions of water deficit weight of 1000 grain of wheat variety Podolyanka was 27.0 g and in treated plants under drought was 31.1 g. It was noted also increasing the number of grains in the ear with the deficit of water in the soil after treatment by antistress agent.

It was studied in a separate vegetation experiment the growing effect of treated plants wheat varieties Poliska 90 and Volodarka of agent hetomik on the degree of contamination of mildew infection of plants. It is established that the complex of fungal extract reduced the infection of plant leaves by mildew by 20-30%. Reducing the infection leaves stabilized productivity of winter wheat under optimal water supplying and elements of mineral nutrition. Simultaneously, it is detected reduction of root rot, which is caused by the infection of fungi-necrotrophs.

Thus, the major complexes of phytohormones, physiologically active substances contained in fungal extracts reduced the negative effect of stress factors, abiotic and biotic nature and allowed to raise the productivity of modern varieties of winter wheat growing in adverse conditions of environment. The most effective fungal extracts appeared during seed germination, seedling growth. Extracts play an important role in reducing infection of the root system of plants. Further study of the physiological action of fungal extracts will create new high-growth regulators for agriculture, which will reduce the use of chemicals to control plant diseases, increase productivity of agricultural plants and quality of food production.

РОЛЬ ОКСИДУ АЗОТУ В ФОРМУВАННІ СИСТЕМНОЇ СТІЙКОСТІ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ ДО ВИСОКОЇ ТЕМПЕРАТУРИ

Жук І.В., Мусієнко М.М.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,Київ, Україна
e-mail: zhuk_bas@voliacable.com

В останнє десятиліття стало очевидним, що оксид азоту (NO) є універсальною сигнальною молекулою рослин, яка бере участь в процесах диференціації, морфогенезу, підвищенні стійкості рослин до абіотичних стресів, тому вивчення фізіологічної ролі NO належить до актуальних проблем сучасної біологічної науки [3]. В клітинах рослин NO продукується за участю ферментів нітратредуктази, ксантиноксидази. В кислих умовах середовища в клітині утворення NO відбувається шляхом дисмутації нітриту, який відновлюється аскорбатом в хлоропластах. Відбувається також світлозалежна конверсія NO_2 в NO каротиноїдами. Сигнальна функція NO реалізується в мікрокомпартментах шляхом утворення комплексів з металовмісними білками гемоглобінами, каталазою, аскорбатпероксидазою. NO здатен модулювати передачу сигналу в клітинах рослин через вплив на рівні цГМФ, цАДФР і Ca^{2+}. Експериментальне дослідження регуляторної дії NO проводять за допомогою екзогенних донорів цього регулятора, одним з яких є нітропрусид натрію (НПН). Встановлено, що обробка рослин донором NO підвищувала стійкість рослин до осмотичного та сольового стресу, зменшував негативну дію ультрафіолетового опромінення. Метою наших досліджень було вивчення ролі NO в регуляції стійкості рослин пшениці до дії високотемпературного стресу. Об'єктами досліджень були сорти озимої м'якої пшениці степового та лісостепового екотипу. Вивчення дії високотемпературного стресу на молоді рослини озимої пшениці проводили в умовах водної культури в модельних лабораторних дослідах. Рослини озимої пшениці сортів Донська напівкарликова, Харус, Поліська 90, Смуглянка, Бенефіс вирощували протягом 7 діб, після чого до поживного середовища рослин дослідних варіантів додавали 0,2 мМ водний розчин НПН. Прогрів рослин дослідних варіантів проводили при температурі 48 °С протягом 3 годин. Після завершення прогріву оцінку реакції рослин на дію стресу та NO проводили за зміною активності пероксидаз за методикою Kar та Mishra [4]. Нашими дослідженнями встановлено, що додавання донору оксиду азоту до середовища вирощування проростків озимої пшениці в умовах водної культури зменшувало дію високотемпературного стресу за рахунок посилення активності антиоксидантних ферментів пероксидаз у клітинах мезофілу листків [1].

Додавання у середовище вирощування молодих рослин пшениці сорту Харус донора NO підвищувало активність пероксидаз у листках через годину після прогріву рослин на 40% вище, ніж у варіанті з прогрівом, але без додавання NO. Через добу після дії високої температури активність пероксидаз в листках пшениці сорту Харус зменшувалась, але на другу та третю добу знову зростала, особливо у варіанті з додаванням донора NO. Додавання донору NO до молодих рослин пшениці сорту Поліська 90 також підвищувала активність пероксидаз одразу після прогріву. Через добу після дії стресу активність пероксидаз суттєво зменшувалась, однак в наступні три доби поступово зростала. Характер динаміки активності пероксидаз у післястресовий період у пшениці сорту Поліська 90 відрізнявся від того, який відзначено у сорту Харус. Додавання донору оксиду азоту за умов оптимального вирощування рослин зменшувало активність пероксидаз. Найнижча активність пероксидаз у сорту Смуглянка відзначена у першу годину після прогріву, протягом наступних 72 годин відбувалось її відновлення, однак рівня контрольного варіанту досягнуто не було. Додавання донору NO за оптимальних умов вирощування спочатку призводило до зростання активності пероксидаз, а через 48 годин зменшувало активність пероксидаз. У поєднанні з прогрівом додавання донора NO спричинило зниження активності пероксидаз, однак протягом 3 діб спостерігалось її зростання і через 72 години активність пероксидаз у цьому варіанті практично зрівнялась з активністю пероксидаз за дії високої температури. Додавання NO до середовища вирощування проростків пшениці сорту Бенефіс спричиняло збільшення активності пероксидаз в перше годину після дії високотемпературного стресу. Через добу активність пероксидаз зростала у варіанті, в якому рослини прогрівали без додавання NO. На третю добу відновного періоду активність пероксидаз у всіх варіантах досліду була майже однаковою. Після прогріву у рослин, які отримували NO, активність пероксидаз зменшувалась нижче рівня контролю. Таким чином, NO в умовах дії високої температури в модельних лабораторних дослідах у молодих рослин пшениці сортів Поліська 90 та Харус посилював активність пероксидаз. Однак у більшості сортів активність пероксидаз за дії NO посилювалась за умов оптимальної температури. У подальших дослідженнях нами було апробовано вплив донору NO за умов природної посухи на активність пероксидаз та продуктивність рослин ярої пшениці [2].

Література

1. *Жук І., Капустян А., Мусієнко М.* Захисна роль оксиду азоту за дії високотемпературного стресу на рослини пшениці - Вісник Київського національного університету ім. Тараса Шевченка. Серія "Інтродукція та збереження рослинного різноманіття" - 2009.- №26 -с. 69-71.
2. *Жук І. В., Мусієнко М.М.* Вплив оксиду азоту на рослини пшениці в умовах посухи // Вісник аграрної науки – 2010. – №5 (685) – с. 32 – 34.
3. *Красиленко Ю.А.,. Емец А. И, Блюм Я. Б.* Функциональная роль оксида азота у растений // Физиология растений. – 2010. –Т.57, №4. – С.483 – 494.
4. *Kar M., Mishra D.* Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence // Plant Physiol. – 1976. – vol.57, №2. – P.315 – 319.

THE ROLE OF NITRIC OXIDE IN FORMATION OF WINTER WHEAT SYSTEM TOLERANCE TO HIGH TEMPERATURE

Zhuk I.V., Musienko M. M.

Taras Shevchenko National University, Kyiv, Ukraine
e-mail: zhuk_bas@voliacable.com

In the last decade it became clear that nitric oxide (NO) is a universal signaling molecule of plants, which is involved in differentiation, morphogenesis, increased tolerance of plants to abiotic stresses, so studying the physiological role of NO is an actual problem of modern biological science [3]. In plant cells NO is produced with enzymes nitrate reductase, xanthine oxidase. In acidic conditions in the cell environment the formation of NO is occured through dismutation of nitrite, which is reduced by ascorbate in chloroplasts. There is also photo dependent conversion of NO_2 to NO by carotenoids. Signal function of NO is realized in microcompartments via formation of complexes with metal-proteins hemoglobins, catalase, ascorbatperoxidase. NO can modulate signal transduction in plant cells by influencing on the level of cGMP, cADFR and Ca^{2+}. The regulatory role of NO is experimentally investigated by using exogenous donors of the regulator, one of which is sodium nitroprusside (NPN). It is established that NO donor treatment of plants increased plant tolerance to salt and osmotic stress, reduced the negative effects of ultraviolet radiation. The aim of our research was to study the role of NO in the regulation of wheat plants tolerance to high temperature stress. Varieties of winter wheat steppe and steppe ecotype were investigated. Study of high temperature stress on young plants of winter wheat was made in water culture in a laboratory model experiments. Plants of winter wheat varieties Donska napivkarlykova, Harus, Poliska 90, Smuglyanka, Benefis grown for 7 days, then the 0.2 mM water solution of NPN was added to nutrient medium of experimental plants. Plants were heated at the temperature 48 °C for 3 hours. Then evaluation of plant response to stress and NO action was performed with the change of peroxidase activity by the method of Kar and Mishra [4]. Our studies established that adding nitric oxide donor to the environment of growing winter wheat seedlings in water culture reduced the effect of high temperature stress by increasing the activity of antioxidant enzymes peroxidase in cells of leaf mesophyll [1].

Add in the environment of growing young plants of wheat variety Harus NO donor increased the activity of peroxidase in leaves of an hour after heating plants by 40% higher than in variant with heating, but without the addition of NO. One day after to high temperatures peroxidase activity in leaves of wheat variety Harus reduced, but the second and third day again increased, especially in the variant with the addition of donor NO. Add NO donor to the young plants of wheat variety Poliska 90 also increased peroxidase activity immediately after heating. One day after the stress of peroxidase activity significantly decreased, but the next three days will gradually grow. The nature of dynamics of peroxidase activity in after stress period in wheat variety Poliska 90 differed from that observed in the variety Harus. Adding a donor of nitric oxide in conditions of optimum cultivation decreased peroxidase activity. Lowest peroxidase activity in a variety Smuglyanka noted in the first hour after heating, within 72 hours its restoration took place, but the level of the control variant was not reached. Add NO donor under optimal growth conditions initially led to an increase in peroxidase activity, and 48 hours decreased peroxidase activity. Combined with heating adding NO donor caused decreased activity of peroxidase, but within 3 days of growth was observed after 72 hours and peroxidase activity in this case for nearly equaled to the activity of peroxidase on to high temperatures. Adding NO to the environment of growing wheat seedlings of the variety Benefis caused increased activity of peroxidase in the first hours after the action of high temperature stress. In a day of peroxidase activity increased in the variant in which the plants were heated without adding NO. On the third day of the restorative period of peroxidase activity in all variants of experiment was almost the same. After heating in the plants receiving NO, peroxidase activity decreased below the control. Thus, NO under conditions of high temperature in model laboratory experiments on young plants of wheat varieties Poliska 90 and Harus strengthened peroxidase activity. However, in most varieties peroxidase activity by NO amplified under optimum temperature. In subsequent studies we have tested the influence of NO donor under natural drought on peroxidase activity and productivity of spring wheat plants [2].

***References**:*

1. *Жук І., Капустян А., Мусієнко М.* Захисна роль оксиду азоту за дії високотемпературного стресу на рослини пшениці - Вісник Київського національного університету ім. Тараса Шевченка. Серія "Інтродукція та збереження рослинного різноманіття" - 2009.- №26 -с. 69-71.
2. *Жук І. В., Мусієнко М.М.* Вплив оксиду азоту на рослини пшениці в умовах посухи // Вісник аграрної науки – 2010. – №5 (685) – с. 32 – 34.
3. *Красиленко Ю.А.,. Емец А. И, Блюм Я. Б.* Функциональная роль оксида азота у растений // Физиология растений. – 2010. –Т.57, №4. – С.483 – 494.
4. *Kar M., Mishra D.* Catalase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence // Plant Physiol. – 1976. – vol.57, №2. – P.315 – 319.

РЕГУЛЯТОРНА РОЛЬ ЦИТОКІНІНІВ В РЕАЛІЗАЦІЇ ПРОДУКТИВНОСТІ ПШЕНИЦІ

Жук В.В., Мусієнко М.М.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
e-mail : zhuk_bas@voliacable.com

Реалізація потенційної продуктивності сортів пшениці інтенсивного типу лімітується несприятливими умовами навколишнього середовища в період формування репродуктивних органів. Дефіцит води і високі температури належать до найбільш вагомих чинників, які обмежують рівень врожайності пшениці. Для зменшення втрат врожаю використовують регулятори росту, які сприяють адаптації рослин, зменшують негативну дію стресових чинників, компенсують дефіцит ендогенних фітогормонів. До найважливіших фітогормонів, вміст яких різко зменшується в умовах посухи належать цитокініни [1]. Дефіцит цитокінінів спричиняє деструкцію пігментних комплексів листків, їх передчасне старіння, що зменшує період функціонування асиміляційного апарату і негативно впливає на продуктивність рослин. Нашими попередніми дослідженнями показано, що деструктивна дія високотемпературного стресу на пігментний комплекс листків молодих рослин пшениці зменшувалась після достресової обробки рослин екзогенним цитокініном 6-бензиламінопурином (6-БАП). Метою наших подальших досліджень було вивчення регуляторної ролі цитокінінів в реалізації потенційної продуктивності рослин ярої м'якої пшениці в умовах природної посухи. Рослини ярої пшениці сортів Скороспілка 95, Скороспілка 99, Недра вирощували в умовах Київської області на дерново-підзолистому ґрунті. У фазі трубкування рослини дослідних варіантів обробляли водним розчином синтетичного цитокініну 6-бензиламінопурину (6-БАП) в концентрації 10^{-4}М. В період цвітіння – формування зернівки рослин ярої пшениці відзначена природна посуха. Після обробки рослин дослідних варіантів екзогенним цитокініном проводили вивчення пігментного складу листків, вмісту води в них, формування зернівок. Після дозрівання рослин проводили аналіз структури врожаю. Нами встановлено, що обробка рослин ярої пшениці 6-БАП стабілізувала пігментний комплекс прапорцевих листків ярої пшениці в період формування зерна.

У рослин пшениці після дії цитокініну збільшувався вміст хлорофілі в період формування зернівки і зберігався на високому рівні до початку молочної стиглості зерна, що забезпечувало достатню кількість асимілятів. Одночасно екзогенний цитокінін сприяв збільшенню вмісту в прапорцевих листках кількості протохлорофілів, що свідчить про затримку старіння листкового апарату. Кількість каротинів та ксантофілів в прапорцевих листках після обробки рослин 6-БАП також збільшувалось, що забезпечувало дисипацію надлишкової теплової та світлової енергії, посилення антиоксидантного захисту клітин листкового мезофілу за дії посухи. Зменшення негативної дії посухи за допомогою екзогенного цитокініну на асиміляційний апарат рослин ярої пшениці сприяло формуванню зерна. Нами встановлено, що у оброблених у фазі трубкування 6-БАП рослин збільшувалась середня висота стебла та довжина прапорцевого листка порівняно з рослинами контрольних необроблених варіантів, затримувалась втрата води прапорцевими листками [3]. Екзогенний цитокінін 6-БАП зменшував дефіцит ендогенних цитокінінів, який виникав в умовах дефіциту води, що подовжувало ростові процеси в останньому міжвузлі та прапорцевому листку. Нами відзначено збільшення кількості зерен в колосі у оброблених БАП рослин пшениці на 4-5 зерен порівняно з контрольними рослинами. Виявлено також збільшення маси 1000 зерен. Так, у пшениці сорту Скороспілка 95 в контролі маса 1000 зерен складала 20,6 г, а після обробки БАП – 27,2 г, у сорту Недра відповідно 28,0 і 33,4 г. Найменший вплив БАП на масу 1000 зерен відзначено у пшениці сорту Скороспілка 99, яка достовірно не відрізнялась в контрольному та дослідному варіантах. Після збирання врожаю вирахували продуктивність вивчених нами сортів. Найменш продуктивним виявився сорт ярої пшениці Скороспілка 95, який в контролі складав 15,6 ц/га, а після обробки 6-БАП складав 24,8 ц/га. У пшениці сорту Недра в контролі врожай складав 26,7 ц/га, а після дії 6-БАП -28,2 ц/га. У пшениці сорту Скороспілка 99 в контролі врожай становив 36,6 , а в досліді – 39,1 ц/га.

Таким чином, використання цитокініну для зменшення негативної дії природної посухи на рослини ярої пшениці дозволило збільшити продуктивність рослин в несприятливих умовах навколишнього середовища. Компенсація дефіциту ендогенного вмісту цитокінінів, який виникає в умовах посухи через зменшення надходження їх з головного джерела – кореня-, забезпечує підтримання ростових процесів, зменшення втрат води, затримку старіння листкового апарату і формування більшої продуктивності.

Література

1.*Романов Г.А.* Как цитокинины действуют на клетку // Физиология растений. – 2009. – Т.56, №2. – с.295-319.
2.*Жук В., Капустян А.* Дослідження протекторних властивостей БАП у Triticum aestivum за умов високотемпературного стресу // Вісник Київського національного університету ім. Тараса Шевченка - 2009.- №26 - с.68-69.
3.*Жук В.В.* Вплив екзогенного цитокініну на водний режим, макроморфогенез і продуктивність ярої пшениці за умов природної посухи // Матеріали V Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (22-25 листопада) – Харків, 2010 – с.263-264

REGULATORY ROLE OF CYTOKININES IN REALIZATION OF WHEAT POTENTIAL PRODUCTION

Zhuk V.V., Musienko M. M.

Taras Shevchenko National University, Kyiv, Ukraine
e-mail: zhuk_bas@voliacable.com

Realization of potential productivity of wheat varieties intensive type is limited by adverse environmental conditions during formation of reproductive organs. Water deficit and high temperatures are among the most important factors limiting the yield of wheat. Growth regulators are used to reduce crop losses and promote the adaptation of plants, reduce the negative effect of stress factors, compensate for the deficit of endogenous phytohormones. One of the most important phytohormones whose content decreases sharply in drought conditions are cytokinines [1]. Cytokinines deficit causes destruction of pigment complexes of leaves, their premature senescence, reducing the period of functioning of assimilation apparatus and affects plant productivity. Our previous studies showed that high destructive effects of stress on pigment complex leaves of young wheat plants decreased after before stress treatment plants by exogenous cytokinin 6-benzylaminopuryn (6-BAP). The aim of our further research was to study the regulatory role of cytokinines in plant productivity potential of spring wheat under nature drought. Plants of spring wheat varieties Skorospilka 95 Skorospilka 99, Nedra were grown in the Kievska oblast on sod-podzolic soil. In the booting phase plants were treated with water solution of synthetic cytokinin 6-benzylaminopuryn (6-BAP) in concentrations of 10^{-4} M. During flowering - seed formation phase of spring wheat plants nature drought was detected. After treatment of plant by exogenous cytokinin leaf pigment complex and the water content in leaves, formation seeds were studied. After maturing plants the structure of the harvest was analyzed. We found that treatment of spring wheat plants by 6-BAP stabilized pigment complex of last leaves of spring wheat during seed formation.

In wheat plants after the action of cytokinines chlorophyll content increased during seed formation and kept on high level to the beginning of milky maturity stage, that provided sufficient amount of assimilates. Simultaneously, exogenous cytokinin content favored to the increasing the content of protochlorophyll of last leaves, indicating a delay of leaf apparatus senescence. Number of carotenes and xantophyll in last leaves after treatment plants 6-BAP also increased, provided that the dissipation of excess heat and light energy, increasing antioxidant protection for mezophyll cells under drought. Reducing the negative effect of drought by exogenous cytokinin to assimilate apparatus of spring wheat plants helped the formation of grain. We found that in treated in a booting phase by 6-BAP increased the average height of plant stems and last leaf length plants compared with untreated by cytokinines control plants, which occurred in conditions of water deficit, that prolonged the growth processes in the last internode and leaf. It is estimated the increasing number of grains in the ear in wheat plants that treated with BAP for 4-5 grains compared with control plants. The weight of 1000 grains also increased. Thus, in wheat variety Skorospilka 95 in the control variant weight of 1000 seeds was 20.6 g, and after treatment BAP - 27,2 g, in variety Nedra respectively 28.0 and 33.4 g. The smallest impact of BAP on weight of 1000 grains observed in wheat variety Skorospilka 99, which did not differ significantly in the control and experimental variants. After harvesting productivity of studied varieties was calculated. The least productive variety was in spring wheat Skorospilka 95, which in controls was 15.6 centner / hectar, and after 6-BAP treatment was 24.8 centner / hectar. In the wheat variety Nedra in control harvest was 26.7 centner / hectar, and after the action of 6-BAP -28.2 centner / hectar. In the wheat variety Skorospilka 99 in the control crop was 36.6, and experiment - 39.1 centner / hectar.

Thus, the using of cytokinines to reduce the negative impact of nature drought on spring wheat plants would increase plant productivity in unfavorable environments. Compensation for deficiency of endogenous cytokinin content, which occurs in drought conditions due to lower revenues from their main source - the root, control the growth processes, and reduce water loss, delay senescence of leaf apparatus and forming higher yields.

References:

1.*Романов Г.А.* Как цитокинины действуют на клетку // Физиология растений. – 2009. – Т.56, №2. – с.295-319.
2.*Жук В., Капустян А.* Дослідження протекторних властивостей БАП у Triticum aestivum за умов високотемпературного стресу // Вісник Київського національного університету ім. Тараса Шевченка - 2009.- №26 - с.68-69.
3.*Жук В.В.* Вплив екзогенного цитокініну на водний режим, макроморфогенез і продуктивність ярої пшениці за умов природної посухи // Матеріали V Міжнародної конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (22-25 листопада) – Харків, 2010 – с.263-264

ВЛИЯНИЕ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ФЕНОЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС ЛИСТЬЕВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

[1]Загоскина Н.В., [1]Оленичeнко Н.А., [2]Осипов В.И.

[1]Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва, Россия
e-mail: phenolic@ippras.ru
[2]Университет Турку, лаборатория органической химии и химической биологии, Финляндия

Высшие растения обладают способностью синтезировать огромное разнообразие вторичных метаболитов, к которым относятся и фенольные соединения (ФС). ФС представлены фенилпропаноидами, флавоноидами, а также дубильными веществами и лигнином. Наличие в структуре ФС ароматических колец и свободных гидроксильных групп делает их высоко реакционноспособными и обеспечивает снижение интенсивности свободнорадикальных процессов, развивающихся в клетках при действии разнообразных стрессовых факторов. К последним относится холодовой стресс, с которым сталкиваются многие культуры, возделываемые в средней полосе России, в том числе и озимая пшеница. Несмотря на значительное число работ, посвященных изучению ее метаболизма, данные о содержании и составе ФС пшеницы немногочисленны.

В связи с этим целью нашей работы являлось изучение состава ФС листьев растений озимой пшеницы и его изменения в процессе закаливания.

Растения пшеницы (*Triticum aestivum* L., озимый сорт Московская 39) выращивали на открытой площадке до фенофазы кущения (45-60 сут), находясь в которой они подвергались действию естественно снижающихся закаливающих температур. Листья пшеницы экстрагировали 96% этанолом, экстракт упаривали досуха и разделяли на фракции полярных и липофильных соединений. Лиофильно высушенные фракции полярных соединений растворяли в 0,5 мл 20% метанола и использовали для анализа фенольных соединений методом ВЭЖХ. Хроматографическая система La Chrom (Merk-Hitachi, Tokyo, Japan) включала насос L-7100, детектор L-7455, позволяющий регистрировать УФ спектры разделяемых соединений в диапазоне 200-650 нм, программируемый автосамплер L-7250 и интерфейс D-7000 для связи системы с компьютером. Использовали колонку Superspher 100 RP-18 (75 x 4 мм, 4 µm, Merck, Germany); растворители – 0,1М ортофосфорная кислота (H_3PO_4) и ацетонитрил (CH_3CN). Профиль элюции: 0-3 мин – 2% CH_3CN в 98% H_3PO_4; 3-22 мин - 2-20% CH_3CN в H_3PO_4 (линейный градиент); 22-29 мин - 20-30% CH_3CN в H_3PO_4 (линейный градиент); 29-35 мин - 30-45% CH_3CN в H_3PO_4 (линейный градиент). Скорость элюции – 1 мл/мин; детекция ФС при 280 нм.

Установили, что фенольный комплекс зеленых тканей представлен главным образом флавоноидами (С- и О-гликозидами апигенина и лютеолина), а также производными феруловой кислоты (изомеры ферулоилхинной кислоты, неохлорогеновая кислота и др.). Доминирующими соединениями среди флавонов являлись производные лютеолина, в том числе изоориентин (5,7,3´,4´-тетраокси-6-С-глюкофлавон) - доля которого составляла примерно половину от относительного содержания всех идентифицированных веществ фенольной природы. При действии низких температур содержание практически всех представителей как фенилпропаноидов, так и флавоноидов в листьях увеличивалось, но значительных изменений в их составе не наблюдалось. Следовательно, в процессе холодовой адаптации озимой пшеницы происходит активация фенилпропаноидного и флавоноидного пути биосинтеза, что может вносить определенный вклад в устойчивость растений к низкотемпературному стрессу.

EFFECT OF COLD HARDENING ON THE PHENOLIC COMPLEX OF WINTER WHEAT LEAVES

[1]Zagoskina N.V., [1]Olenichenko N.A., [2]Ossipov V.I.

[1]Timiriazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
e-mail: phenolic@ippras.ru
[2]University of Turku, Laboratory of Organic Chemistry and Chemical Biology, Finland

Higher plants manifest a unique capability of the synthesis of a large amount of phenolic compounds or polyphenols . They include phenylpropanoids, flavonoids, tannins, and lignin. The presence of aromatic rings and free hydroxyl groups in the structure results in a high chemical activity of many phenolics. Therefore, such compounds take part in plant defense against various stress factors. One of these factors is cold stress, which affects various crops inhabiting Middle Russia, such as winter wheat. In spite of numerous publications dedicated to studying wheat metabolism, the data about the content and composition of phenolic compounds in wheat are very scarce.

The aim of this work was to compare the composition and content of particular phenolic compounds in leaves of control and hardened winter wheat plants by HPLC method.

Winter wheat (*Triticum aestivum* L.,frost-resistant cv. Moskovskaya 39) plants were used. The plants were grown in open ground until the phenophase of thillering (45–60 days). For studying the composition of phenolics by HPLC, the wheat leaves were extracted with 96% ethanol. The extract was evaporated until a dry residue and used for obtaining fractions of polar and lipophilic compounds. Phenolic compounds were analyzed by HPLC after dissolving of lyophilized fraction of polar compounds in 0.5 ml of 20% methanol. The chromatographic La Chrom system (Merck-Hitachi, Japan) was used. It comprised an L-7250 detector, which allowed recording the UV-spectra of separated compounds in the range of 200-650 nm and the Superspher 100 RP-18 column (75 x 4 мм, 4 µm, Merck, Germany). 0.1 M H_3PO_4 and acetonitrile (CH_3CN) were used as solvents. The elution profile was: 0–3 min—98% H_3PO_4; 3–22 min—2–20% CH_3CN in H_3 PO_4; 22–29 min—20–30% CH_3CN in H_3PO_4; 29–35 min—30–45% CH_3CN in H_3PO_4 (linear gradient). The flow rate was 1 ml/min; the compounds were detected at 280 nm.

It was shown that green tissues contained mainly flavonoids, especially flavons (C- and O-glycosides of apigenin and luteolin), and also ferulic acid derivatives (isomers of feruloylquinic acid, neochlorogenic acid and other). Among flavons, derivatives of luteolin dominated, including isoorientin (5,7,3',4'-tetraoxy-6-C-glucoflavon) , which comprised approximately a half of the content of all identified phenolic compounds. Low temperature induced the accumulation of phenolic compounds in winter wheat leaves, whereas their qualitative composition was not practically changed.

In general, phenolic compounds play a substantial role in winter wheat adaptation to low temperature. The changes in phenolics metabolism, manifested in the accumulation of phenylpropanoids and flavonoids (predominantly flavons) in plant leaves, can contribute to plant resistance to cold stress.

ВЛИЯНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *PSEUDOMONAS AUREOFACIENS* НА ЦИТОКИНИНОВУЮ АКТИВНОСТЬ СЕМЯН И ПРОРОСТКОВ ТОМАТА

Колмыкова Т.С., Ибрагимова С.А.

ГОУВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Саранск, Россия
e-mail: tskolmykova@mail.ru

Очень часто перед учеными и практиками стоит задача получить тот или иной фиторегулятор. Учитывая сложность строения некоторых аналогов фитогормонов, наладить их синтез in vitro или не представляет возможным, или связано со слишком высокими затратами. Решение проблемы в таких случаях часто находят полностью или частично синтезируя необходимую молекулу при помощи микроорганизмов. Данные иммуноферментного анализа показали, что в условиях проведенного эксперимента штамм *Pseudomonas aureofaciens* ИБ 6 способен синтезировать цитокинины, максимальный выход которых может составлять150 нг/мл культуральной жидкости [1]. На кафедре биотехнологии Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева отселекционирована чистая культура бактерий *Pseudomonas aureofaciens* штамм 2006 [2]. Целью исследования стало изучение действия культуральной жидкости *Pseudomonas aureofaciens* штамм 2006 на содержание активных форм цитокининов в растениях томата (*Lycopersicon esculentum*) сортов Грунтово-Грибовский и Боярин.

Семена томата предварительно обрабатывали культуральной жидкостью *Ps. aureofaciens* с титрами 10^{12} КОЕ/мл, 10^{10} КОЕ/мл и 10^{8} КОЕ/мл с добавлением 0,05% ксантана в качестве связующего компонента. Обработку проводили путем кратковременного механического перемешивания. Определение живых бактериальных клеток на поверхности обработанных семян проводили, используя метод предельных разведений. Контролем служили растения без предварительной обработки семян. После предпосевной обработки у семян и проростков всех вариантов определяли содержание активных форм цитокининов методом биотеста на прорастание семян огурца и синтез хлорофилла в его семядолях [3].

Определения содержания цитокининов в семенах томата сорта Грунтово-Грибовский показали, что предпосевная обработка *Ps. aureofaciens* титрами 10^{12} и 10^{10} КОЕ/мл уменьшала содержание свободных форм цитокининов на 11 и 8 % соответственно по сравнению с контролем (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние предпосевной обработки семян культуральной жидкостью *Ps. aureofaciens* штамм 2006 на содержание активных форм цитокининов в семенах и проростках томата, нг/г сухой массы

Вариант	Сорт Грунтово-Грибовский		Сорт Боярин	
	семена	проростки	семена	проростки
Контроль	6,5±0,3	8,8±0,3	5,0±0,3	7,5±0,3
10^{12} КОЕ/мл	5,8±0,2	12,0±0,5	5,5±0,2	10,6±0,5
10^{10} КОЕ/мл	6,0±0,3	11,2±0,5	5,4±0,2	10,0±0,5
10^{8} КОЕ/мл	6,5±0,3	9,0±0,4	5,0±0,2	8,0±0,4

У семян томата сорта Боярин предпосевная обработка семян культуральной жидкостью с титрами 10^{12} и 10^{10} КОЕ/мл стимулировала образование свободных форм цитокининов на 10 и 8 % соответственно по сравнению с контрольными вариантами. Титр 10^{8} КОЕ/мл не оказал ни какого эффекта на динамику активности цитокининов.

У 7-дневных проростков мы наблюдали иную тенденцию. У растений томата изучаемых нами сортов отметили увеличение количества активных форм цитокининов по сравнению с контрольным вариантом. Причем чем выше титр живых клеток биопрепарата, тем выше активность цитокинина. У сорта растений Грунтово-Грибовский титры культуральной жидкости 10^{12} и 10^{10} КОЕ/мл увеличивали содержание активных цитокининов соответственно на 36 и 27 % относительно контроля. Более низкий титр 10^{8} КОЕ/мл также увеличивал содержание свободных цитокининов, но в меньшей степени – на 2% относительно контроля, но эти значения были в пределах допустимой ошибки. У растений сорта Боярин проявилась та же закономерность: титры культуральной жидкости *Ps. aureofaciens* 10^{12} и 10^{10} КОЕ/мл увеличивали содержание активных цитокининов на 41 и 33 % соответственно относительно контроля. Более низкий титр 10^{8} КОЕ/мл увеличивал этот показатель на 7 %.

Таким образом, что предпосевная обработка семян томата культуральной жидкостью *Ps. aureofaciens* штамм 2006 титрами 10^{12} и 10^{10} КОЕ/мл снижает уровень активных цитокининов в семенах сорта Грунтово-Грибовский и увеличивает их у семян сорта Боярин. Титр культуральной жидкости 10^{8} КОЕ/мл не влияет на активность цитокининов в семенах томата. Предпосевная обработка семян *Ps. aureofaciens* штамм 2006 увеличивает содержание свободных форм цитокининов у 7-дневных проростков томата обоих изучаемых сортов. Чем выше титр живых клеток биопрепарата, тем выше активность цитокининов в проростках.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта АВЦП Рособразования «Развитие научного потенциала высшей школы» (проект № 2.1.1 (624)

Литература:

1 *Архипова Т. Н.* Сравнение действия штаммов бактерий, различающихся по способности синтезировать цитокинины на рост и содержание цитокининов в растениях пшеницы / Т.Н. Архипова, С.Ю.Веселов, А.И. Мелентьев [и др.] //Физиология растений. – 2006. – Т.53, № 4. – С. 567-574.

2 *Лукаткин А. А.* Оптимизация условий культивирования бактерий *Pseudomonas aureofasiens* на послеспиртовой барде / А.А. Лукаткин, С.А.Ибрагимова, В.В. Ревин // Новые технологии в экспериментальной биологии и медицине. – М. – 2007. – С.144-145.

3 *Полевой В. В.* Фитогормоны / В.В. Полевой. – Л., 1982. — 289 с.

EFFECT OF CULTURE IN LIQUID PSEUDOMONAS AUREOFACIENS CYTOKININ ACTIVITY SEEDS AND SPROUTS TOMATO

Kolmykova T.S., Ibragimova S.A.

Mordovia State University, Saransk, Russia
e-mail: tskolmykova@mail.ru

Very often the scientists and agronomist are aiming to get one or the other phytoregulators. Given the complexity of the structure of some analogues of phytohormones, to establish their synthesis in vitro or not possible, or is associated with too high costs. The probleme is often solved by complete or partial syntheses of molecule needed by microorganisms. Data analysis showed that the experimental conditions strain of Pseudomonas aureofasiens IB 6 ways to synthesize cytokinins, the maximum yield that can sostavlyat 150 ng/ml of culture fluid [1]. Employee of the Department of Biotechnology Mordovia State University created culture of bacteria Pseudomonas aureofaciens strain 2006 [2]. The aim of the research was to study the action of culture fluid aureofasiens Pseudomonas strain 2006 on the content of active cytokinins in plants of tomato (Lycopersicon esculentum) varieties of Gruntovo -Gribovsky and Boyarin.

Tomato seeds werw treated with tne drug Ps. aureofaciens and added a 0.05% xanthan for bonding components. Biologocal product had titers 10^{12} unite, 10^{10} unite, 10^{8} unite. Presowing seeds was carried by short mechanical agitation. Definition of living bacterial cells on the surface of the treated seeds was carried out using the method of limiting dilutions. Served as control plants without pre-treatment of seeds. After pre-processing of seeds and seedlings of all the options defined content of active cytokinins by bioassay on germination of seeds of cucumber and synthesis of chlorophyll in its cotyledons [3]. The content of active cytokinins in seeds were determined 24 hours after the pre-processing of biological preparations. The content of cytokinins in seedlings were determined after seven day after the first seedling.

Determining the content of cytokinins in seeds of tomato varieties Gruntovo-Gribovsky showed that pre-sowing treatment of Ps. aureofaciens titers in 10^{12} and 10^{10} unite decreased the content of free cytokinins by 11 and 8% respectively compared with controls (Table 1).

Table 1 - Effect of treatment before sowing seed culture fluid Ps. aureofaciens 2006 on the content of active cytokinins in seeds and seedlings of tomato, ng /g dry weight

Option	Grade Gruntovo-Gribovsky		Grade Boyarin	
	seed	sprouts	seed	sprouts
Control	6.5±0.3	8.8±0.3	5.0±0.3	7.5±0.3
10^{12} unite	5.8±0.2	12.0±0.5	5.5±0.2	10.6±0.5
10^{10} unite	6.0±0.3	11.2±0.5	5.4±0.2	10.0±0.5
10^{8} unite	6.5±0.3	9.0±0.4	5.0±0.2	8.0±0.4

In seeds of tomato varieties Boyarin, we noted that pre-sowing seed treatment with culture fluid with titles in 10^{12} and 10^{10} unite stimulated the formation of free cytokinins by 10 and 8% respectively compared with control options. Only titer 10^{8} unite did not have any effect on the dynamics of the activity of cytokinins. In 7-day-old seedlings, we observed a different trend. In tomato plants we studied cultivars noted an increase in the number of active cytokinins compared with the control variant. The higher titer of live cell biological product, the higher the activity of cytokinin. In plant varieties Gruntovo-Gribovsky titers of culture fluids 10^{12} and 10^{10} unite increased the content of active cytokinins, respectively, 36 and 27% relative to controls. Lower titer of 10^{8} unite also increased the content of free cytokinins, but to a lesser extent - by 2% relative to controls, but these values were within the permissible error. In plants, varieties Boyarin manifested the same pattern: titres of culture fluid Ps. aureofaciens 10^{12} and 10^{10} unite increased the content of active cytokinins on 41 and 33% respectively relative to controls. Lower titer of 10^{8} unite increased the rate of 7%. So that pre-sowing seed treatment with tomato culture fluid Ps. aureofaciens strain 2006 titles in 10^{12} and 10^{10} unite decreases the level of active cytokinins in the seeds of class Gruntovo-Gribovsky and increases in seed varieties Boyarin. Titer of culture fluid 10^{8} unite did not affect the activity of cytokinins in seed of tomato. Pre-sowing seed treatment with Ps. aureofaciens strain 2006 increased content of free cytokinins in 7-day-old tomato seedlings of both studied cultivars. The higher titer of live cells biological product, the higher the activity of cytokinin in seedlings.

References:

1 *Архипова Т. Н.* Сравнение действия штаммов бактерий, различающихся по способности синтезировать цитокинины на рост и содержание цитокининов в растениях пшеницы / Т.Н. Архипова, С.Ю.Веселов, А.И. Мелентьев [и др.] //Физиология растений. – 2006. – Т.53, № 4. – С. 567-574.

2 *Лукаткин А. А.* Оптимизация условий культивирования бактерий *Pseudomonas aureofasiens* на послеспиртовой барде / А.А. Лукаткин, С.А.Ибрагимова, В.В. Ревин // Новые технологии в экспериментальной биологии и медицине. – М. – 2007. – С.144-145.

3 *Полевой В. В.* Фитогормоны / В.В. Полевой. – Л., 1982. — 289 с.

ПІДВИЩЕННЯ АДАПТАЦІЇ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ РОСЛИН ДО ВПЛИВУ НА НИХ НЕСПРИЯТЛИВИХ ПОГОДНИХ УМОВ

Крамарьов С.М., Федорченко Ю.М.

Інститут зернового господарства НААН України, Дніпропетровськ, Україна
e-mail: kramaryov@yandex.ua

Продуктивність сільськогосподарських культур і якість вирощеної продукції в значній мірі залежать від погодних умов, що склалися впродовж їх вегетаційних періодів. В більшості випадків онтогенез рослин не завжди супроводжують сприятливі погодні умови. В зимовий період на озимі культури діють низькі температури, а в весняно-літній період, навпаки, на них здійснюють негативний вплив посуха та низька відносна вологість повітря. Одним із найнебезпечніших чинників зимового періоду є, звичайно, великі морози. Стійкість до їхнього впливу в рослин озимих культур називається морозостійкістю, яка варіює залежно від культури, сорту, віку та стану рослин, а ще від етапу перезимівлі в досить широких межах. Підсумок перезимівлі залежить від сили морозу, генетичних особливостей сорту, а також умов, що пом'якшують негативну дію цього стресового чинника. Передусім, це товщина снігового покриву, глибина промерзання ґрунту, поступовість зниження температури, а також технологічні заходи, що сприяють загартуванню рослин. Серед них важливу роль відіграють якість обробітку ґрунту і глибина загортання насіння під час його висівання в грунт, ступінь забезпечення рослин поживними речовинами, макро- і мікроелементами, правильний вибір сорту, попередника та дотримання оптимальних строків висіву. Іноді в сурові зими навіть і цих захисних факторів не вистачає, щоб в повній мірі зберегти рослини від вимерзання. Особливо сильні пошкодження озимих культур відбуваються в тому випадку коли агротехніка їх вирощування порушується, тоді після зимівлі їх посіви стають зрідженими, а іноді і зовсім гинуть. Так, в зимовий період 2002/2003 рр. вимерзли навіть стійкі до цього чинника сорти озимої пшениці, озимого ячменю, не говорячи вже про озимий ріпак. Лише озиме жито та тритикале змогли витримати такі жорсткі погодні умови і перезимувати вийшовши з зими з значними пошкодженнями. В результаті господарства несуть додаткові витрати по пересіву на площах де загинули озимі культури, що в кінцевому підсумку погіршує їх фінансове становище. Ушкодження та загибель зимуючих рослин зумовлені замерзанням води в міжклітинниках і клітинах, яке супроводжується механічним травмуванням біологічних мембран. В процесі дії морозу, в клітинах меристематичних тканин відбувається порушення обміну речовин та функціональної активності мембран. Під впливом низьких температур у міжклітинному просторі та в судинах ксилеми, проходить формування кристалів льоду. Найбільшої шкоди завдає перепад температур, що, спостерігається в кінці зими або ранньою весною.

В весняно-літній період під впливом високих температур в тканинах рослин проходить розкладання молекул білків з утворенням токсичного аміаку. За таких умов зростає інтенсивність транспірації, рослини знижують тургор. На проходження загартування озимих культур до низьких, а ярих зернових, навпаки, до високих температур, можна впливати препаратом («Антістрес») з підвищеною кріопротекторною і адаптогенною дією. До складу цього препарату входять 4 компоненти: 1) комплексний полімерний препарат Марс EL, який містить плівкоутворювач та продукти метаболізму симбіотичного гриба-ендофіта; гумати калію і натрію; 2) гліцерин; 3) диметилсульфоксид; 4) KH_2PO_4. Експериментально визначена норма витрат препарату становить 1,7 л/га. Кожен з вище зазначених компонентів після нанесення препарату на поверхню рослин виконую свою відповідну функцію: Марс EL виключає здування й осипання нанесених компоненті з поверхні листків; завдяки KH_2PO_4 проходить нагромадження в клітинах вузла кущення водорозчинних вуглеводів, що викликає підвищення концентрації клітинного соку, відбувається інтенсивний розвиток кореневої системи й глибше залягає вузол кущення. Гліцерин зменшує кількість вільної води в цитоплазмі клітин; диметилсульфоксид підвищує гнучкість та еластичність мембран і сприяє зростанню проникнення в цитоплазму клітин катіонів калію та фосфат-іонів

RISE OF THE GRAIN-CROPS ADAPTION TO THE UNFAVOURABLE WETHER CONDITIONS INFLUENCE

Kramaryov S.M., Fedorchenko Yu.N.

Istitute of Crop Farming, National Academy of Sciences of Ukraine, Dnepropetrovsk, Ukraine
e-mail: kramaryov@yandex.ua

Crops productivity and the quality of what is produced from them is to a great extent depended on weather conditions during vegetation periods. Favorable weather conditions not always accompany ontogenesis of plants. Winter crops are affected by low temperatures over a winter period, but such factors as drought and low relative air humid, on the contrary, have a bad effect on them in the spring and in the summer. Bitter frosts are undoubtedly the most dangers for grain-crops in winter-time. Winter crops plants stability to low temperatures force is called frost proof; it varies within the broad limits depending on crop, variety, age, state of the plants, and on the stage of wintering also. The result of wintering depends on a force of frost, variety genetic peculiarities and also conditions that moderate the hostile action of that stress-factor. These conditions are^ carpet of snow thickness, depth of frost, temperature gradual reduction, and also the technical measures that contribute to plants tempering. Quality of soil cultivation, depth of the seeds sowing$ the degree of proving plants with nutritive, macro- and microelements$ right choice of a variety, a forerunner and sowing terms optimum are very important among technical measures. But in the hard winters these protective measures are not enough to prevent plants from be destroyed by frost. Particularly heavy damage of the winter crops occurs when cultivating agrotechnics are broken. During the winter period of 2002-2003 years even frost proof varieties of winter wheat, winter barley and winter rape were destroyed by frost. Only winter rye and triticosecale bore hard weather terms but with considerable damage. As a result farms bore additional expenditure of means and lab our when they are forced to sow the lost winter crops once again. Freezing the water in the intercellular space and in the cells causes mechanical damage of the spending the winter plants biological membranes. Frost violates metabolism tissues. Low temperatures form ice crystals in the intercellular space and in the vascular tissues. The end of winter and the beginning of spring are the periods when the temperatures alterations often ruin winter crops.

High temperatures of spring and summer decompose albumen molecules and toxic ammonia is come into being in the tissues of plants. These circumstances increase transpiration intensity and bring down turgor.

Acquired toughness winter crops to low temperatures spring crops to high temperatures can be fulfilled by using «Antistres» preparation with adaptive and cryoprotection functions. “Antistres” is the four components compound which decreases free water quantity in cells cytoplasm, increases pliability and elasticity of membranes concentration of cell juice contributes to roots in clusters development.

СТИМУЛЮЮЧІ ВЛАСТИВОСТІ ПОЛІГЕКСАМЕТИЛЕНГУАНІДИНУ

Лисиця А.В.

Інститут епізоотології НААН, Рівне, Україна
e-mail: lysycya@ukr.net

Зазвичай полімерні похідні гуанідину, зокрема полігексаметиленгуанідин (далі ПГМГ), використовуються для дезінфекції або в якості антисептиків. ПГМГ володіє бактерицидними, фунгіцидними, віроцидними і альгіцидними властивостями.

На підтвердження давно відомої тези про те, що одна й та сама речовина в певних дозах може бути отрутою, а в інших – ліками, ще наприкінці минулого століття з'явилися дані про ростостимулюючі властивості дезінфектанта ПГМГ. При передпосівному протруюванні насіння пшениці 0,1-1,0% розчинами ПГМГ хлориду було виявлено, що препарат не лише захищає насіння від ураження грибками (*Alternarium*, *Penicillum*, *Mucor*, *Fusarium*), а й стимулює його проростання [1].

Нами було досліджено і підтверджено стимулюючий вплив полігексаметиленгуанідину на проростання насіння деяких сільськогосподарських культур. Серед випробуваних солей ПГМГ з органічними і неорганічними кислотами найкращий результат отримано для ПГМГ сукцинату. Визначено оптимальний склад препарату для передпосівного 15 хв замочування насіння. Для буряку максимальні значення схожості та енергії проростання (зростання у 2 рази порівняно із контролем) характерні для концентрацій препарату 0,1-0,5 %, а для гороху – для концентрацій 0,001-0,01 %. Для злакових культур кращими виявилися концентрації 0,005-0,05 %, зокрема, для кукурудзи зростання схожості при цих концентраціях становило 10-15 %, а енергії проростання збільшувалася на 50-100 %, для пшениці зростання становило близько 40 % за обома показниками [2].

Теоретичне обґрунтування механізмів стимулюючої дії ПГМГ відсутнє. Оскільки молекули полімеру досить великі (молекулярна маса зазвичай становить 1 - 10 кДа), то потрапляння його всередину клітини ускладнене. Проте, цей препарат є мембраноактивною сполукою, він впливає на структуру і функції цитоплазматичної мембрани клітин. Можна припустити, що механізм стимуляції в першу чергу пов'язаний із зміною проникності мембрани для води та іонів H^+, K^+, Na^+ та ін. Можливо, що стимуляція пов'язана із механізмами стресової адаптації. Полікатіон ПГМГ зв'язується з аніонними ліпідами цитоплазматичної мембрани, вони внаслідок латеральної дифузії стягуються до місць адсорбції молекул полімеру, окремі ділянки мембрани переходять з рідкокристалічного в кристалічний стан, утворюються домени збагачені кислими або нейтральними фосфоліпідами. Адаптивні механізми клітини включають синтез нових полярних ліпідів з більшим відсотком насичених жирних кислот. Новосинтезовані ліпіди, вбудовуючись в мембрану, компенсують функції тих, що незворотно зв'язалися з полікатіоном. Ці процеси впливають на проліферативну активність.

Відомо, що алогічний до ПГМГ препарат полігексаметиленбігуанідин (ПГМБГ) в концентрації 0,00002 - 0,0002 % може стимулювати проліферацію кератоцитів людини, а в більших концентраціях діє цитотоксично [3]. ПГМБГ може також впливати на експресію певних генів *E. coli*, синтез ферментів тощо [4].

Здатність солей ПГМГ з органічними кислотами прискорювати загоєння ран була використана нами у ветеринарній медицині для захисту шкіри вимені великої рогатої худоби і рук персоналу, що працює з тваринами. В результаті низки лабораторних та клінічних випробувань отримана нова захисна мазь для вимені, яка крім антисептичних та пом'якшуючих властивостей, має ранозагоюючу і протизапальну дію [5].

Література:

1. *Гембицкий П.* Защита пшеницы от биоповреждений / П. Гембицкий, К. Ефимов // Хлебопродукты. – 1999. – № 11. – С. 26-27.
2. *Лисиця А.В.* Стимулювання проростання насіння полімерними похідними гуанідину / А.В. Лисиця // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2010. - № 3 (19). Електронне видання http:// www.nbuv.gov.ua/e-journals/Nd/2010-3/10lavpdg.pdf.
3. *Wiegand C.* Proliferationsforderung und biokompatibilitat von polihexanid / C. Wiegand, M. Abel, A. Kramer, G. Muller, P Ruth, U.-C. Hipler // GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinar. – 2007. – V. 2(2). Електронне видання http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2007-2/dgkh000076.shtml.
4. *Allen M.J.* The response of *Escherichia coli* to exposure to the biocide polyhexamethylene biguanide / M.J. Allen, G.F. White, A.P. Morby // Microbiology. – 2006. – V. 152. – P. 989–1000.
5. Пат. 53487 Україна, МПК (2009) А61К 31/00. Мазь захисна для вимені „Інстеп" / *М.С. Мандигра, А.В. Лисиця, Ю.М. Мандигра-Мельник, І.М. Дмитрієв.* – заявл. 01.04.2010; опубл. 11.10.2010, Бюл. № 19.

STIMULATIONS CHARACTERISTIC OF POLYHEXAMETHYLENEGUANIDINE

Lysytsya A.V.

Epizootology institute of NAAS, Rivne, Ukraine
e-mail: lysycya@ukr.net

Polymeric derivates of guanidine, including polyhexamethyleneguanidine (PGMG), use usually for disinfection or as antisepsis. PGMG has a good antibacterial, antifungal and others characteristic.

All know that one and ditto material can be a poison in one concentration and medicine in others. Information appeared as far back as end past centuries about that that PGMG has a characteristic to stimulate the growing seeds. Seeds wheat's processed 0,1 - 1,0 % solution PGMG before sowing. PGMG protects the seeds from defeat fungus (*Alternarium, Penicillum, Mucor, Fusarium*) and in the same way stimulate the germination of seeds [1].

We have done the studies and have confirmed that PGMG stimulates the germination of seeds some cultural plants. Succinate of PGMG has shown the best results amongst all salts of PGMG with organic and inorganic acids. We have defined the optimum composition of the preparation for soaks of seeds before sowing for 15 minutes. The best concentrations of the preparation for beet there is 0,1 - 0,5 % (the energy of the germination increased in 2 times), for pea - 0,001-0,01 %, for cereal - 0,001-0,01 %. For instance, energy of the germination of corns increased on 50-100 %, for wheat - on 40 % [2].

The theoretical motivation mechanism stimulation action of PGMG is absent. The molecules of the polymer have great size; their molecular masses are 1 – 10 кDa. The preparation cannot easy penetrate inside cell. However PGMG affects actively to the cell membrane, changes its structure and functions. The mechanism of stimulation is possible caused by change to permeability of the cellular wall and cytoplasm's membrane for water and ion H^+, K^+, Na^+ and others. The other reason of stimulation is caused possible mechanism to stressful adaptation. The molecules polycationes of PGMG link with anionic lipids of cytoplasm's membrane. Rather adsorption to the cell membrane will lead to a sequestration of common acidic phospholipids into domains comprised of single rather than mixtures of the phospholipids. Thus, in the presence of PHMG the homogeneous distribution of phospholipids normally associated with biological membranes is transformed into a mosaic of individual phospholipids domains. Each of these will have different phase transition properties causing the membrane to fragment into fluid and liquid crystalline regions. As with other cationic biocides this is manifested as a generalized cellular leakage, first of small cationic materials such as potassium ions and later by losses of intracellular pool materials. Adaptive mechanisms are included in cell; these are syntheses of new phospholipids, reinforcement proliferation activities and others.

The polyhexamethylene biguanide (PHMB) is analogue of PGMG. It has a positive effect on the proliferation of human keratinocytes in concentrations up to 2 µg/ml (0,00002 - 0,0002 %). On the other hand, higher concentrations of PHMB inhibit cell proliferation or were directly cytotoxic to the tested cell types in vitro. PHMB can cause the induction of some genes of *E. coli* and the implication of enzymes [4].

We used in veterinary medicine ability salts of PGMG to accelerate healing by wounds. The new defensive unguent for udder is created, it possesses antiseptic and softening characteristic reduces inflammation, healing wounds [5].

References:

1. *Гембицкий П.* Защита пшеницы от биоповреждений / П. Гембицкий, К. Ефимов // Хлебопродукты. – 1999. – № 11. – С. 26-27.
2. *Лисиця А.В.* Стимулювання проростання насіння полімерними похідними гуанідину / А.В. Лисиця // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2010. - № 3 (19). Електронне видання http:// www.nbuv.gov.ua/e-journals/Nd/2010-3/10lavpdg.pdf.
3. *Wiegand C.* Proliferationsforderung und biokompatibilitat von polihexanid / C. Wiegand, M. Abel, A. Kramer, G. Muller, P Ruth, U.-C. Hipler // GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinar. – 2007. – V. 2(2). Електронне видання http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2007-2/dgkh000076.shtml.
4. *Allen M.J.* The response of *Escherichia coli* to exposure to the biocide polyhexamethylene biguanide / M.J. Allen, G.F. White, A.P. Morby // Microbiology. – 2006. – V. 152. – P. 989–1000.
5. Пат. 53487 Україна, МПК (2009) А61К 31/00. Мазь захисна для вимені „Інстеп" / *М.С. Мандигра, А.В. Лисиця, Ю.М. Мандигра-Мельник, І.М. Дмитрієв.* – заявл. 01.04.2010; опубл. 11.10.2010, Бюл. № 19.

ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ С ДОБАВКАМИ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ И РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ НА УРОЖАЙНОСТЬ И КАЧЕСТВО ПРОДУКЦИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

Пироговская Г.В.

РУП «Институт почвоведения и агрохимии», Республика Беларусь, Минск, Республика Беларусь
e-mail: brissa_pir@ mail.ru

К настоящему времени в мировой практике получен широкий спектр биологически активных соединений и регуляторов роста растений (природного, химического, растительного и микробного происхождения) и изучено в той или иной степени их влияние на рост и развитие растений, продуктивность сельскохозяйственных культур. В Республике Беларусь разработаны и применяются в сельскохозяйственном производстве различные регуляторы роста растений, полученные из торфа, бурого угля, торфа и вермикомпоста, из вторичных ресурсов (отходов крахмальных, бродильных и растительных производств) и регуляторы роста растений, полученные химическим путем (брассиностероиды). Отдельные регуляторы роста растений используются: при инкрустации семян; в составе твердых и жидких азотных и комплексных удобрений (в том числе с добавками микроэлементов, включая и хелатные их соединения); в качестве некорневых подкормок в период вегетации сельскохозяйственных культур. Эффективность регуляторов роста растений изучена на многих культурах и имеется большой объем экспериментальных данных, свидетельствующих о положительном их влиянии на рост и развитие растений, повышение урожайности и улучшении пищевой ценности и качества продукции.

Установлено что применение комплексных удобрений с модифицирующими добавками (микроэлементами и регуляторами роста растений) обеспечивает, по сравнению со стандартными туками**:** при внесении удобрений *под озимую пшеницу* - повышение урожайности зерна в среднем на 5,2 ц/га, улучшение показателей качества зерна за счет увеличения содержания сырого белка на 0,24-0,50%, клейковины на 0,9-1,2% и сбора незаменимых аминокислот в среднем на 6,5 кг/га; *под яровые зерновые культуры* – увеличение урожайности зерна яровой пшеницы в среднем на 5,8 ц/га, ячменя – 3,0, ярового тритикале – 3,3, овса – 4,0 ц/га и содержания белка в зерне на 0,2-0,7%; критических аминокислот на 1,4-3,3 г/кг зерна, незаменимых аминокислот на 0,21-0,62 г/кг зерна; *под крупяные культуры (гречиху и просо)* – прибавку зерна гречихи от бесхлорных удобрений в среднем 5,2 ц/га (на 1,1-4,6 ц/га выше, по сравнению с хлорсодержащим удобрением), повышение содержания критических аминокислот на 0,89 г/кг зерна, лизина - от 4,04 до 5,14 г/кг зерна; *под картофель* – увеличение урожайности клубней картофеля в пределах от 20 до 48 ц/га, при одновременном улучшении качества клубней за счет повышения крахмала, товарности клубней и снижения в них нитратов; *под многолетние злаковые травосмеси* – увеличение продуктивности трав на 4,2-8,8 ц/га к.е., соответственно *бобово-злаковые* – на 5,3-17,9 ц/га к.е., клевера – в среднем на 26 ц/га (сухое вещество), с качеством кормов I-II класса, с повышенным содержанием протеина и соответствующим зоотехническим нормативам.

EFFECT OF MINERAL FERTILIZERS WITH THE ADDITIVES OF MICROELEMENTS AND PLANT GROWTH REGULATORS ON PRODUCTIVITY AND QUALITY OF AGRICULTURAL CROPS PRODUCTION

Pirahouskaya H.

«Institute of Soil Science and Agrochemistry», Republic of Belarus, Minsks, Republic of Belarus
e-mail: brissa_pir@ mail.ru

To the present time in world practice the wide spectrum of biologically active compounds and plant growth regulators of (natural, chemical, vegetative and microbe origin) is received and their influence on growth and development of plants, efficiency of agricultural crops to some extent is investigated. In the Republic of Belarus are developed and applied the various plant growth regulators received from peat, brown coal, peat and vermicompost, from secondary resources (wastes of starched, fermenting and vegetative manufactures) and plant growth regulators are received by a chemical way (brassinosteroides) in agricultural manufacture. The separate plant growth regulators are used: in seeds inlay; in structure of hard and liquid nitric and complex fertilizers (including with the additives of microelements and their chelate compounds); as not root dressing in the period of agricultural crop vegetation. The efficiency of plant growth regulators is investigated on many crops and there is a large volume of experimental data showing of their positive influence on growth and development of plants, increase of productivity both improvement of food value and quality of production.

The application of complex fertilizers with the modifying additives (microelements and plant growth regulators) provides in comparison with standard fertilizers: in application under a winter wheat - grain productivity increasing on the average on 5,2 c/ha, improvement parameters of grain quality at the expense of increase of the crude protein contents at 0,24-0,50 %, gluten on 0,9-1,2 % and tax irreplaceable amino acids on the average on 6,5 kg / ha; under summer grain crops - increase of grain productivity of summer wheat on the average on 5,8 c/ha, barley - 3,0, summer triticale - 3,3, oats - 4,0 c/ha and protein contents in a grain on 0,2-0,7 %; critical amino acids on 1,4-3,3 g/kg of a grain, irreplaceable amino acids on 0,21-0,62 g/kg of a grain; under grains crops (buckwheat and millet) - increase of a grain buckwheat from chlorine free fertilizers on the average 5,2 c/ha (on 1,1-4,6 c/ha is higher, in comparison with chlorine- containing fertilizer), increase of the critical amino acids contents 0,89 g/kg of a grain, lysine - from 4,04 up to 5,14 g/kg of a grain; under a potatoes - increase of productivity potatoes tubers in limits from 20 up to 48 c/ha, at simultaneous improvement of tubers quality at the expense of increase of starch, tuber marketability and reduction in them nitrates; under perennial cereals mixtures - increase of grass efficiency on 4,2-8,8 c/ha f.u., accordingly legumen-cereals - on 5,3-17,9 c/ha f.u., clover - on the average on 26 c/ha (dry substance), with forages quality of I-II class, with the increased protein contents and appropriate zootechnical specifications.

ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ АУКСИНОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЗАСУХОУСТОЙЧИВОСТИ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Ткачёв В.И., Ярошенко Е.А., Фаткова Н.Н.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев, Украина
e-mail: elen-yaroshenko@yandex.ru

Важную роль в адаптации агропроизводства к изменениям климата играют биологически активные вещества синтетического и природного происхождения, научное обоснование их применения в условиях недостатка влаги является актуальной задачей физиологии растений.

Для повышения засухоустойчивости озимой пшеницы нами предложено использовать комплексный препарат в составе полиэтиленгликоля (ПЭГ) разных молекулярных масс и стимулятора роста ауксинового действия, который не создаёт прочных ковалентных связей с полимером. ПЭГ массой более 1000Д образует пористый матрикс на поверхности листовой пластинки, проницаемый для CO_2 и ограничено проницаемый для паров воды, а вкрапления ПЭГ меньшей молекулярной массы имеют свойство проникать в межклеточное пространство и даже через клеточную стенку и могут выступать в роли транспортного агента для ауксина. Для обоснования применения препарата нами на основании исследований отличий между физиологическими и биохимическими параметрами сортов озимой пшеницы разных экотипов установлено, что их засухоустойчивость определяется площадью активной поверхности корневой системы, энергетическим зарядом листьев, интенсивностью фотодыхания и регулируется соотношением эндогенных фитогормонов стимулирующего действия, в том числе, отношением ауксинов к цитокининам в корнях. Нашими исследованиями доказано, что как допосевная обработка семян, так и обработка растений по вегетации ауксином в комбинации с ПЭГ при действии засухи стимулирует рост корневой системы и, особенно, активной её части, для засухоустойчивых сортов. Отношение активной поверхности к общей возрастает при действии препарата, причём при обработке ауксином проявляется сильнее, чем при действии других регуляторов роста, в том числе, хлорхолинхлорида, данный эффект сохраняется после восстановления оптимального водоснабжения. Показано, что изменение эндогенного пула фитогормонов после обработки растений препаратом способствовало увеличению площади общей и активной поверхности корневой системы за счёт снятия апикального доминирования цитокининов в корнях и обусловливало усиление фотосинтетических процессов, увеличение уровня содержания АТФ и повышение, таким образом, адаптационного потенциала растений в условиях засухи.

В вегетационных и полевых опытах проведена оценка биологической эффективности обработки ауксином с ПЭГ разных молекулярных масс и установлено повышение засухоустойчивости растений, уменьшение потерь урожая от недостаточного водоснабжения, что даёт возможность использования данного препарата в технологии выращивания озимой пшеницы.

SUBSTANTIATION OF AUXINS APPLICATION FOR INCREASE OF WINTER WHEAT DROUGHT-RESISTANCE

Tkachev V.I., Yaroshenko E.A., Fatkova N.N.

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: elen-yaroshenko@yandex.ru

Biologically active substances of synthetic and natural origin play important role in the adaptation of agricultural production to climate changes, the scientific substantiation for their use in a lack of moisture is an important task of Plant Physiology.

To improve the drought resistance of winter wheat we have proposed to use complex preparation consisting of polyethyleneglycol (PEG) of different molecular weights and growth stimulator auxin action, which does not create a strong covalent bonds with the polymer. PEG content exceeding 1000D forms a porous matrix on the surface of the leaf blade, impervious to CO_2 and limited permeable to water vapor, and insertions at the PEG molecular weight tend to penetrate into the intercellular space, and even through the cell wall and can act as a transport agent for auxin. To justify the use of the preparation on the basis of our studies the differences between physiological and biochemical parameters of winter wheat varieties of different ecotypes revealed that their drought tolerance is determined by the active surface area of root system, energize the leaves, the intensity of photorespiration and is regulated by endogenous phytohormones stimulating action, including the ratio of auxins to cytokinins in roots. Our studies have shown that as presowing seed treatment and processing plants in the vegetation of auxin in combination with PEG under the action of drought stimulates root growth, and especially its active part, for drought-resistant varieties. The ratio of active surface area to the total increase under the action of the preparation, and in the processing of auxin is stronger than the action of other growth regulators, including chlorholinchloride, this effect persists after the restoration of optimum water supply. It was shown that change in endogenous phytohormones pool after plants treatment by preparation contributed to an increase in total area and the active surface of the root system by removing the apical dominance of cytokinins in the roots and cause the enhancement of photosynthetic processes, increase in ATP content and improve, thus the adaptive capacity of plants under drought conditions.

In the greenhouse and field experiments assessed the biological effectiveness of auxin treatment with PEG of different molecular weights and found an increase in drought resistance of plants, reducing crop losses from inadequate water supply, which enables the use of this preparation in the technology of winter wheat cultivation.

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА РАСТЕНИЙ – ОСНОВА ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНОГО УПРАВЛЕНИЯ ВРЕДНЫМИ ОРГАНИЗМАМИ ФИТОЦЕНОЗОВ

[1]Чумак П.Я., [2]Выгера С.М.

[1]ННЦ "Институт биологии" Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, Киев, Украина
e-mail: ChumakP@i.ua
[2]Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, Украина
e-mail: vigera@nauu.Kiev.ua

В интегрированных системах защиты растений от вредных организмов значительное место занимают синтетические пестициды. Серьезным недостатком использования пестицидов оказалось подавление ими естественных регулирующих механизмов в биоценозах, что приводит к массовому размножению нецелевых вредных организмов, численность которых до этого не достигала экономически значимого уровня. Для уменьшения влияния пестицидов на окружающую среду при защите растений от вредных организмов и избегания возникновения устойчивости к синтетическим препаратам необходимо постоянно обновлять арсенал средств за счет малотоксичных органических соединений с принципиально новыми механизмами действия на целевые объекты. Одним из перспективных направлений является использование биологически активных веществ растительного происхождения – алкалоидов, гликозидов, эфирных и жирных масел и других соединений. Накоплен значительный опыт использования инсектицидных свойств некоторых видов растений. Как правило, для уничтожения вредных организмов используют порошки и экстракты растений с добавлением эмульгаторов. Эффективность таких препаратов очень низкая, что сдерживает их широкое применение. Создание на их основе принципиально новых препаратов и усовершенствование приемов их использования есть новым этапом совершенствования интегрированной системы защиты растений. Одним из способов совершенствования этого направления есть усиление антибиотического действия ингибиторов с помощью введения ряда других природных веществ, которые сами по себе не токсичны. Особый интерес представляет создание многокомпонентных препаратов на основе биологически активных веществ растений. В связи с этим нами была предпринята попытка создания многокомпонентных препаратов, которые мы назвали фитокомплексонами. Фитокомплексоны – сложные препараты, основу которых составляют биологически активные вещества растений, растительные масла и эмульгатор.

По данным испытаний разработанных нами композиций были отобраны наиболее эффективные препаративные формы, в состав которых входили водные вытяжки табака, перца горького, масло рапса и эмульгатор. Сочетание этих компонентов в определенных пропорциях значительно расширяет спектр вредных организмов, против которых можно использовать этот препарат и усиливает инсектофунгицидное влияние в сравнении с применением каждого с них в отдельности. Так, например, техническая эффективность комплексона (табак, перец горький, масло рапса, эмульгатор) в 1,0% концентрации используемого против обыкновенного паутинного клеща Tetranychus urticae Koch. составила 71,36±5,2%. Эффективность препарата на основе табака и эмульгатора составила лишь 58,31± 6,2%, а перца горького и эмульгатора - 47,66± 7,9%. Исользование комплексона против мучнистой росы Microshaera azaleae U. Braun обусловило эффективность 81,34±6,58%, в то время как препараты табака и горького перца оказались совершенно не эффективными.

Следует отметить, что стратегия и тактика использования фитокомплексонов в интегрированной системе защиты растений от вредных организмов отличается от тактики применения синтетических пестицидов. Согласно общепринятой концепции интегрированной системы защиты растений синтетические инсектициды используются с учетом экономического порога численности (ЭПЧ) вредных организмов. Учитывая сравнительно низкую смертность вредных видов от фитокомплексонов, по сравнению с синтетическими инсектицидами, препараты на основе экстрактов растений следует использовать не на основе данных ЭПЧ, а значительно ранее - до достижения численности порога вредоносности (ПВ) целевых объектов.

BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF PLANTS AS BASIS OF ECOLOGICALLY SAFE MANAGEMENT OF PHYTOCENOSIS PESTS

[1]Chumak P.Ya., [2]Vygera S.M.

[1]ESC "Institute of Biology, Kyiv National Taras Shevchenko University, Kyiv, Ukraine
e-mail: ChumakP@i.ua
[2]National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail: vigera@nauu.Kiev.ua

The synthetic pesticides occupy a considerable place in an integrated system of plant protection from pests. The grave shortcoming of pesticides usage was their suppression of the natural regulatory mechanisms in biocenosis resulting in massive reproduction of non-target pests, whose numbers had not reached before the economically significant level. To reduce the effect of pesticides on the environment while protecting plants from pests and avoiding the emergence of resistance to synthetic drugs must be continuously renovated the store of facilities for account of the low-toxic organic compounds with fundamentally new mechanisms of action on targets. The use of biologically active phytogenous substances - alkaloids, glycosides, essential and fatty oils as well as the other compounds is one of the perspective directions. The considerable experience in the usage of insecticidal properties of some plant species is accumulated. As a rule, to destroy harmful organisms the powders and vegetable extracts with addition of emulsifiers are using. The effectiveness of these drugs is very low, that restrains their widespread application. The creation on their basis of the fundamentally new drugs and improvement of methods of their usage is a new stage of improving of the integrated system of plant protection. One of the ways to improve this approach is an increasing antibiotic action of inhibitors by introducing a number of other natural substances which their own aren't toxic. The creation of multicomponent drugs based on biologically active substances of plants is of special interest. In this regard, we attempted to create the multi-component drugs, which we called phytocomplexones. The phytocomplexones are complex drugs that are based on biologically active substances of plants, vegetable oil and emulsifier.

According to the tests of our worked out compositions, the most effective preparative forms, which include the aquatic extract of tobacco, bitter pepper, canola oil and emulsifier, were selected. The combination of these components in certain proportions greatly expands the range of pests against which you can use this drug and increases the insect-fungicidal effect in comparison with its application separately. For example, the technical efficiency of complexon (tobacco, bitter pepper,, canola oil, emulsifier) at 1.0% concentration used against Tetranychus urticae Koch. was 71,36 ± 5,2%. The effectiveness of the drug on the basis of tobacco and emulsifier was only 58,31 ± 6,2%, and pepper bitter and emulsifier - 47,66 ± 7,9%. The usage of complexon against Microshaera azaleae U. Braun caused the effectiveness of 81,34 ± 6,58%, while drugs of tobacco and bitter pepper were completely ineffective.

It should be noted that the strategy and tactics of the phytocomplexones usage in the integrated system of plant protection from pests is different from the tactics of the synthetic pesticides application. According to the generally accepted concept of the integrated system of plant protection, the synthetic insecticides are used, taking into account the economic numbers threshold (ENT) of pests. Considering the relatively low mortality of harmful species from phytocomplexones, compared with the synthetic insecticides, the drugs based on vegetable extracts should not be used on the basis of ETN data, but much earlier - before reaching the harnfulness threshold (HT) of targets.

ВЛИЯНИЕ ТРИЭТАНОЛАМИНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА ТЕРМОТОЛЕРАНТНОСТЬ ГОРОХА

Шигарова А.М., Коротаева Н.Е., Боровский Г.Б.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений, Иркутск, Россия,
e-mail: nastyabul82@mail.ru.

В природе растения подвергаются ряду неблагоприятных факторов, в том числе резким перепадам температур. В настоящее время актуальность приобретает поиск экологически безопасных стимуляторов роста растений, обладающих адаптогенными свойствами при неблагоприятных условиях окружающей среды в микромолярных, наномолярных и сверхнизких концентрациях. Из числа биологически активных веществ (БАВ) особый интерес для растениеводства могут представлять практически безвредные для животных организмов некоторые производные триэтаноламина. К ним относятся кремнийорганические соединения силатраны: 1-метил-, 1-метил-4-хлор- и 1-этоксисилатран (сокращенно МС, ХМС, ЭС, соответственно) Положительное влияние этих соединений в низких дозах на рост и развитие растений показано для широкого ряда культур в полевых экспериментах (Воронков М.Г, Барышок В.П., 2005). Однако физиологические механизмы и концентрации, в которых эти вещества способны оказывать действие на растения, не были изучены.

Эксперименты проводили, используя 2-суточные этиолированные проростки гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Марат, выращенные при 22 °С на дистиллированной воде. Растительный материал подвергали тепловым обработкам при 38 и 45°С. Проростки гороха, при определении термотолерантности, помещали в термостат с температурой 45°С на 6 ч без предварительного закаливания из 22°С (рис. 1) и с предварительным закаливанием - 6 ч при 38°С (рис. 2). После гипертермии проростки переносили в 22°С, подсчёт выживших проростков гороха проводили спустя 5 суток инкубации при этой температуре. Обработку БАВ проводили в течение 6 часов при 22°С (режим 22 → 45°С), либо при 38°С (режим 38 → 45°С) непосредственно перед действием летальной температуры (6 ч. 45°С).

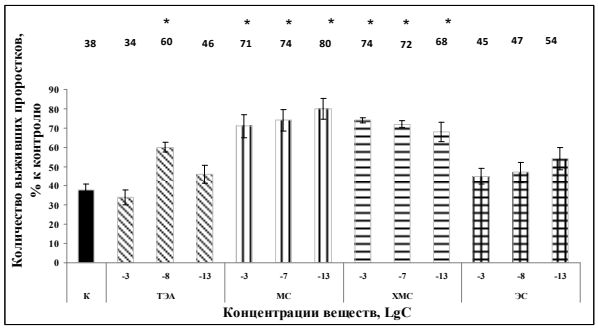


Рис. 1. Процент выживших проростков гороха после действия летальной температуры в условиях температурного режима 22°С → 45°С. * – достоверное отличие термотолерантности гороха в данном температурном режиме в сравнении с контролем (по t-критерию Стьюдента, p<0,05). LgC – логарифмы молярных концентраций для БАВ.

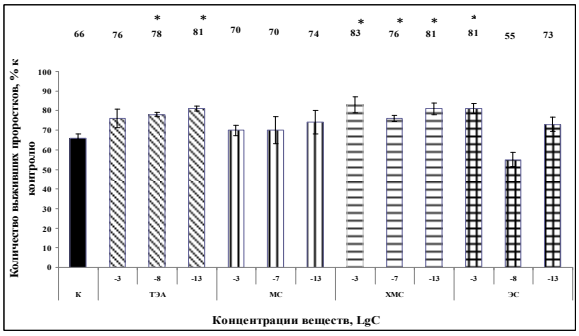


Рис. 2. Процент выживших проростков гороха после действия летальной температуры в условиях температурного режима 38°С → 45°С. Обозначения см. подпись к Рис. 1.

Полученные результаты позволяют условно разделить исследованные БАВ на две группы. БАВ первой группы (ТЭА и ЭС) не оказывали стимулирующего действия на термотолерантность проростков гороха при действии на них повреждающей температуры (45°С) (исключение составлял ТЭА в концентрации 10^{-8} М). Предобработка гороха БАВ второй группы (МС и ХМС) значительно (почти в два раза) увеличивала количество выживших проростков при последующем действии на них летальной температуры. Важно отметить, что значительное увеличение термотолерантности силатранами (МС и ХМС) происходило только после предобработки в условиях оптимальной температуры 22°С.

Детальный биохимический механизм действия ТЭА, МС, ЭС, ХМС на растительную клетку остается неизвестным, но на основании полученных нами данных можно предположить, что растворы МС оказывают адаптогенное действие и увеличивают термотолерантность, стабилизируя дыхание клеток корней гороха, а растворы ХМС через ряд факторов – увеличение содержания стрессовых белков, стабилизацию дыхания клеток корней гороха и повышение стабильности клеточных мембран.

Литература:

1.*Воронков М.Г., В.П. Барышок* / Силатраны в медицине и сельском хозяйстве .- Новосибирск: СО РАН, 2005. – 257с.

IMPACT OF TRIETHANOLAMINE AND ITS DERIVATIVES ON PEA THERMAL TOLERANCE

Shigarova A.M., Korotayeva N.E., Borovskii G.B.

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry. Irkutsk, Russia,
e-mail: nastyabul82@mail.ru.

In nature plants are subjected to a number of unfavorable factors including sharp temperature fluctuations. Currently search for environmentally safe plant growth stimulators manifesting adaptogenic properties under unfavorable environmental conditions in micromolar, nanomolar and super-low concentrations is very important. Among biologically active substances (BAS) of particular interest for plant production may be some derivatives of triethanolamine, which are virtually safe for animal organisms. They include silicon-organic compounds – silatrans: 1-methyl-, 1-methyl-4-chlorine- and 1-etoxisilatran (abbreviated as MS, CMS, ES, respectively). Positive impact of these compounds in low doses on plant growth and development was demonstrated for a wide range of cultivars in field tests [1]. Physiological mechanisms and concentrations, in which these substances may produce positive effect on plants, were, however, not studied.

The tests were conducted on 2 days old etiolated pea (*Pisum sativum* L.) seedlings, Marat cultivar, grown at 22 °C on distilled water. Plant material was subjected to thermal treatment at 38 and 45°C. To determine thermal tolerance, pea seedlings were placed in thermostat with the temperature 45°C for 6 hours without preliminary hardening from the 22°C environment (Fig. 1) and with preliminary hardening – 6 hours at 38°C (Fig. 2). After hyperthermia the seedlings were transferred to 22°C environment, surviving pea seedlings were counted 5 days after the incubation at this temperature. BAS treatment was conducted for 6 hours at 22°C (mode 22 → 45°C), or at 38°C (mode 38 → 45°C) immediately prior to exposure to lethal temperature (6 hours 45°C).

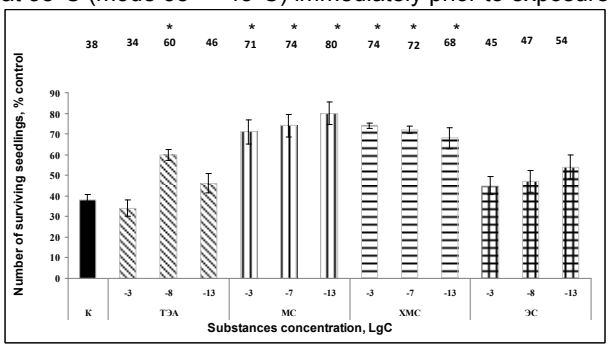


Fig. 1. Percentage of surviving pea seedlings after the exposure to lethal temperature in temperature mode 22 → 45°C. All experiments were repeated a minimum of three times. The data obtained were analyzed statistically, arithmetic means and SE (n=3) are presented. * – reliable difference of pea thermal tolerance in the given temperature mode as compared to control (as per Student's t-criterion, p<0,05). LgC – logarithms of molar concentrations for BAS.

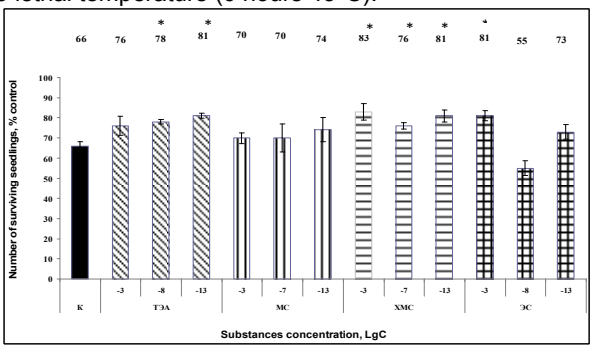


Fig. 2. Percentage of surviving pea seedlings after the exposure to lethal temperature in temperature mode 38°C → 45°C. Legends – see Fig. 1.

The results acquired allow to conventionally split the BAS investigated into two groups. BAS of the first group (TEA and ES) did not produce stimulating effect on thermal tolerance of pea seedlings under the impact of damaging temperature (45°C) (with the exception of TEA in the concentration of 10^{-8} M). Preliminary treatment of pea by BAS of the second group (MS and CMS) significantly (almost twice) increased the amount of surviving seedlings under further impact of lethal temperature. It should be noted that significant increase of thermal tolerance by silatrans (MC and CMS) was observed only after preliminary treatment under optimal temperature of 22°C.

Detailed biochemical mechanism of TEA, MS, ES, CMS on plant cell remains unknown, but on the basis of the data acquired we may suppose that MC solutions produce adaptogenic impact and enhance thermal tolerance, stabilizing pea root cells respiration, and CMS solutions – through a number of factors – increase of stress proteins content, stabilization of pea root cells respiration and increase of cell membranes stability.

References:

1. *Voronkov M.G., Baryshok V.P.* / Silatrans in medicine and agriculture. – Novosibirsk: SD RAS, 2005. – 257p.

Вопросы охраны интеллектуальной собственности в сфее разработки и производства биологически активных веществ

Intellectual property in the development and production of bioactive substances

Спонсор Конференции

BIO-RAD

BIO-RAD Laboratories

Обладнання і реагенти для дослідницьких, медичних та промислових лабораторій

Компанія BIO-RAD (США) є найбільшим світовим виробником лабораторного та аналітичного обладнання. На сьогодні BIO-RAD представляє широку гамму обладнання для дослідницьких та промислових лабораторій:

- **ПЛР-ампліфікатори CFX96 Real Time**
- **Обладнання та реагенти для геном них та протеомних досліджень**
- **Обладнання для рідинної хроматографії**
- **Обладнання, реагенти і витратні матеріали для електрофорезу та блоттінгу**
- **Системи анализу зображення. Документуючі системи. Програмне забеспечення**

За додатковою інформацією щодо технічних можливостей та вартості продукції компанії BIO-RAD просимо Вас звертатися до регіонального представництва компанії в Україні за адресою:

Київ, 02160, проспект Возз'єднання 7а, оф. 315
Тел.: (050) 446-21-13, (050) 448-34-56
e-mail: office@bio-rad.com.ua
www.bio-rad.com

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ПАТЕНТ – ВСЕГДА ЛИ ОН НУЖЕН? (ИЛИ НЕСКОЛЬКО СЛОВ О СТРАТЕГИИ ПАТЕНТОВАНИЯ)

Агуреев А.П.

ООО «Союзпатент», Москва
e-mail: nfo@sojuzpatent.com

Так сложилось, что отечественный ученый (советский или постсоветский), выполняя то или иное исследование, не особенно задумывается над тем, а что же дальше. Чаще всего успех в исследовании – это повод к продолжению поиска. Иными словами чаще всего им движет поиск нового ради еще более нового, пусть и не обязательно востребованного в хозяйственном обороте. Возможно, отсутствие реальной материальной мотивации обуславливает такое поведение исследователя. Вместе с тем, вряд ли какой из авторов не заинтересован в том, чтобы возместить (или, по крайней мере, частично вернуть) собственные усилия или средства, потраченные на уже состоявшееся большое или не очень большое открытие нового.

К сожалению, приходится уже продолжительное время наблюдать, что, возможно по причине малой информированности, отечественный изобретатель, не в полной мере использует существующие инструменты охраны технических решений. Чаще всего, он прибегает к подаче заявок на получение патента в национальные патентные ведомства. Это конечно оправдано, если в его распоряжении мощности по производству конечного продукта или имеется в виду закрытие национального рынка для иностранного производителя аналогичного продукта. Однако, чаще всего отечественный исследователь не мотивирован ни тем, ни другим. В такой ситуации (то есть при отсутствии стороны, заинтересованной в покупке собственно патента, продукта по патенту и т.п.) подача заявки на патент и тем более получение и поддержание национального патента в течение 20-летнего срока – пустая трата денег.

Вместе с тем существуют уже длительное время возможности для молодых амбиционных или уже состоявшихся ученых средства (пути) заявить о себе в области техники, где работает исследователь. Международное сообщество разработало и осуществило такой инструмент, как международная заявка на патент, которая предоставляет гораздо большие возможности для охраны и представления интересов изобретателя. Некоторые из них: стандартный подход к составлению заявки, общий подход к оценке патентоспособности, квалифицированный поиск и заключение международной предварительной экспертизы, публикация на международном языке, автоматическое включение в базу данных всех ведущих патентных ведомств, и т.д. (Далее обсуждаются преимущества для разработчика подачи международной заявки на патент.)

NATIONAL PATENT: IS IT ALWAYS NECESSARY? (OR SOME WORDS ABOUT THE STRATEGY OF PATENTING)

Agureev A.P.

OOO "Sojuzpatent", Moscow
e-mail: nfo@sojuzpatent.com

The fact is that a scientist in our country (Soviet or Post-Soviet), when he carries out a research, does not think much of "what next?" Most often, a success in a research means the continuation of the investigation. In other words, the scientist is motivated with a search for a novelty in order to discover a further novelty, no matter whether it will be in great demand in the economy or not. It is possible that the absence of real material incentives determines such behavior of the scientist. However, it is doubtful that any author is not at all interested in compensation (at least in partial reward) of his efforts or expenses connected with a great or not very great new discovery made.

It is a pity to see for a long time already that, obviously for the reason of being not well informed, an inventor in our country does not use in full measure the existing tools of protection of technical solutions. Most often, he files applications for patents with the National Patent Offices. It is reasonable of course if he has at his disposal the production potentialities for the manufacture of a final product, or in view of closing the national market for a foreign manufacturer of an identical product. However, most often a researcher in our country is motivated by neither of the foregoing. In this situation (i.e., in the absence of a participant interested in buying a patent per se, a product according to patent, etc.), filing a patent application and, particularly, obtaining and keeping the patent in force for 20 years is simply a waste of money.

However, there are, already for a long time, the possibilities (the means and ways) for young ambitious or noted men of science to claim the rights in the art they work. The international community has worked out and put into practice such tool as an international patent application that offers far greater possibilities to protect and represent interests of the inventor. Here are some of them: a standard approach to preparing an application, the general approach to assessment of patentability thereof, a competent patent search and opinion of the international preliminary examination, publication in the international language, an automatic inclusion into the dBase of all leading patent offices, etc. (In what follows, there are discussed advantages of filing an international application for an author).

ДОСТУПНОСТЬ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ПАТЕНТОВАНИИ ИЗОБРЕТЕНИЙ

Головач Т.Н.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины, Киев
e-mail: Golovacht@ukr.net

Большинство национальных патентных законодательств относительно заявок, которые касаются микроорганизмов, используют Правило 28 Европейской патентной конвенции, которое обосновывает необходимость депонирования микроорганизмов в уполномоченных независимых учреждениях, и руководствуются при таком депонировании «*Будапештским договором*» и Инструкцией к нему (1, 2, 3).

Закон Украины "*Об охране прав на изобретения и полезные модели*» признает объектом изобретения штамм микроорганизма и способ их использования. Требование депонирования реализованно в "*Правилах составления и подачи заявки на изобретение и заявки на полезную модель*", процедура регламентирована соответствующей Инструкцией. Депонирование осуществляется до даты подачи заявки на изобретение и действует 30 лет. Такую процедуру проводят уполномоченные учреждения, перечень которых согласовывает Кабинет Министров Украины. Так, Депозитарий Института микробиологии и вирусологии Национальной академии наук Украины является единственным в Украине официально утвержденным учреждением, которое проводит депонирование непатогенных микроорганизмов.

Депонированные штаммы имеют ограничение в использовании и распространении на протяжении срока действия патента. Вопрос доступа к депонированным образцам решается патентным законодательством Украины в основном так: (А) до публикации сведений о выдаче патента образец предоставляется лишь по запросу депозитора или с его разрешения; (В) после публикации сведений о выдаче патента образец выдается Депозитарием любому заинтересованному лицу на запрос, оформленный соответствующим образом, при условии, что запрашивающий берет обязательство использовать штамм лишь для экспериментальных исследований и не передавать его третьему лицу.

Национальные патентные законодательства других стран решают проблему допуска к депонированным образцам микроорганизмов и установления ограничений на их распространение и использование по-разному (4). Основные ограничения действуют до публикации сведений о выдаче патента или до выдачи самого патента. После указанного события микроорганизм становится доступным любому лицу как и само изобретение. Наиболее либеральны патентные законодательства США, Канады, Югославии, Филиппин - выдача защищенных патентами штаммов осуществляется без ограничений. С условием не передавать образец третьим лицам выдают депонированные микроорганизмы во Франции, Швеции, Бельгии, Китае, Исландии, ЮАР, Дании, Испании, Финляндии, Англии, Норвегии, Сингапуре. Более жесткие ограничения действуют в Японии, Корее, Италии, Нидерландах, Польше и Болгарии - штамм выдается после обязательства не передавать его третьим лицам и использовать лишь для научно-исследовательских работ. Существуют и иные ограничения, например, не перевозить через границу (Германия).

После исчерпания патента штамм становится обычным коллекционным и согласно норм Всемирной федерации коллекций культур (WFCC) выдается любому лицу без ограничений (с учетом требований безопасности, норм этики, авторского права).

Защита микробиологических и биотехнологических изобретений в промышленно развитых странах нормативно урегулирована, однако идет постоянное дальнейшее развитие регуляторных процедур (5, 7). Более широко принципы доступа от скрининга биоматериала до его патентования и коммерциализации регулируются Конвенцией ООН о биологическом разнообразии и Боннскими руководящими принципами к Конвенции (6, 7).

Литература

1. *Головач Т.М.* Патентное депонирование биоматериалов и Конвенция ООН о сохранении биологического разнообразия. 10-я международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы охраны интеллектуальной собственности» Материалы выступлений. Алушта. 11-15 сентября 2006. С. 84-88.
2. Regulations to the Convention on the Grant of European Patents (EPC). Rule 28. –1996.
3. Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the purpose of Patent Procedure and Regulations – WIPO, Geneva, 1989. – 53 p.
4. Guide to the Deposit of Microorganisms under Budapest Treaty – Geneva: World Intellectual Property Organization, 1998 (publication N 661(E)).
5. European Directive on the Legal Protection of Biotechnological Inventions ("Biotechnology Directive") EC 44/98. 1998.
6. Convention on Biological Diversity, 1992.
7. Bonn Guidelines to the Convention on Access to Genetic Resources and Benefit-sharing, 2002.

AVAILABILITY STRAIN OF MICROORGANISMS AT PATENTING INVENTIONS

Golovach T.N.

Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine
e-mail: Golovacht@ukr.net

The majority of national patent legislations for applications which concern microorganisms, use the Rule 28 of European patent conventions which justify necessity of deposit of microorganisms in the authorized independent institutions, and are guided at deposition «Budapest Treaty» and the Regulations to it (1, 2, 3).

The law of Ukraine "*On the protection of rights to inventions and utility models*» recognizes the strain of microorganism and method of its using as object of the invention. Demand of deposition is determined in "*Rules of compiling and application for the invention and applications for the utility model*", the procedure is regulated by the respective Instruction. Deposition is carrying out before date of application of the invention and is acting 30 years. Such procedure is put into practice by the authorized institutions the list of which is approved the Council of Ministers of Ukraine. So, the Depositary of Institute of microbiology and virology of the National academy of sciences of Ukraine is unique in Ukraine and officially affirmed of institution which carries out deposition of non-pathogenic microorganisms.

Deposited strains have restriction in use and distribution during validity of the patent. The question of access to deposited samples is solved in the patent legislation of Ukraine basically so: (A) before the publication of data of grant of patent the sample is given only on inquiry of depositor or from his sanction; (B) after the publication of data of grant of patent the sample is given to any interested person on the his inquiry which takes the obligation to use strain only for experimental researches and to not transfer its to third party.

National patent legislations of other countries solve a problem of the access to deposited samples of microorganisms and establishments of restrictions on their distribution and use differently (4). The basic restrictions exist before the publication of data on grant of patent or before grant of patent. After the mentioned event the microorganism becomes accessible to any person as well as the invention. Patent legislations the USA, Canada, Yugoslavia, Philippines most liberal - distribution of strains protected by patents is carried out without restrictions. With a condition to not transfer a sample to the third parties the deposited microorganisms give out in France, to Sweden, Belgium, China, to Iceland, the republic of South Africa, to Denmark, Spain, Finland, England, Norway, Singapore. More rigid restrictions operate in Japan, Korea, Italy, Netherlands, Poland and Bulgaria - strain is given out after the obligation to not transfer its to third parties and to use only for research works. There are also other restrictions, for example, to not transport through border (Germany).

After exhaustion of patent the strain becomes usual collection culture and becomes access to any person without restrictions (taking into account requirements of safety, norms of ethics, the copyright) what agree with norms of the World federation of culture collections.

Protection of microbiological and biotechnological inventions in industrially advanced countries lawfully is settled (5, 7), however there is a further constant development of regulatory procedures. More widely principles of access to genetic resources from screening to commercialization are regulated by *the Convention of the United Nations on Biological Diversity* and *Bonn Guidelines to the Convention (6, 7).*

References:

1. *Golovach T.N* Patent deposition biomaterials and Convention on Biological Diversity. 10-я international conference «Issues of *the protection of* intellectual property». Soft goods appearance. Alushta 11-15 September 2006. P. 84-88.
2. Regulations to the Convention on the Grant of European Patents (EPC). Rule 28. –1996.
3. Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the purpose of Patent Procedure and Regulations – WIPO, Geneva, 1989. – 53 p.
4. Guide to the Deposit of Microorganisms under Budapest Treaty – Geneva: World Intellectual Property Organization, 1998 (publication N 661(E)).
5. European Directive on the Legal Protection of Biotechnological Inventions ("Biotechnology Directive") EC 44/98. 1998.
6. Convention on Biological Diversity, 1992
7. Bonn Guidelines to the Convention on Access to Genetic Resources and Benefit-sharing, 2002.

АГРОПРОДОВОЛЬСТВЕННАЯ ВЕБ ПЛАТФОРМА

[1]Симак В., [1]Макри А., [1]Дрэганча Б., [2]Котора Л.

[1] Национальный Институт Исследований и Развития для Пищевых Биоресурсов - ИБА Бухарест, Бухарест, Румыния
e-mail: simacv@yahoo.com, viorel.simac@bioresurse.ro
[2] Интегратор А.О., Бухарест, Румыния, e-mail: liviu.cotora@integrator-group.com

Управление знаниями рассматривается сегодня, в большинстве существующих системах, как на основе структурированной организации передовой практики, знания, информации, компетенций, опыта и партнерских отношений, касающихся различных областях, в общем воссоединились как таковой под названием нематериальных ценностей. Недостаток этих статических систем состоит в том что они создают нематериальные ценности через процессы и, возможно, с помощью процедур сосредоточенных на отдельных лицах, а не на общин и, следовательно, создается большое количество информации, хранящейся на уровне индивида, очень вероятно, излишним, с неопределенными выгодами, с относительной доступностью, трудного и занимающего много времени извлечения. Кроме того, отсутствие общей совместной платформы на уровне общин, участвующих в совместных программах для создания знания представляют собой главное препятствие в достижении управлением знаниями, выравниваными по стратегии организации.

Основное предположение этой совместной веб-платформы есть важность знать существующие механизмы, условия и аспекты производства знаний, несмотря на те, которые связанны с передачей и использованием новых знаний и, следовательно, расширению изучения связи между научными исследованиями и инновации, как это осуществляется посредством сотрудничества в деятельности научных исследований и развития. Одним из основных результатов Агропродовольственной Платформы Управлением Знаниями (Агро-Прод ПУЗ) состоит в стимуляции участия в международных исследовательских проектах, платформа обеспечивает всеобъемлющие рамки для управления нематериальными ценностями и инструменты для защиты конкурентоспособных и конкретных знаний, с максимизацией партнерских взносов и результатов.

Другие результаты, касающиеся улучшения производительности нематериальной ценности:

- поглощение и распространение опыта исследователей;
- сохранение базы знаний, в контексте экспертов покинувших институт / организацию;
- стимулирует сотрудничество и вклад ценности компании;
- совершенствование процесса управления знаниями;
- лучшая администрация нематериальных ресурсов организации и контроль за их вкладом к выполнению стратегических целей организации.

Схематически, корреляция между этими результатами и их полезность представлена на *рисунке 1*.

Это исследовательская система для управления научными знаниями может быть успешно внедрировано после этого, помимо агропродовольственной сфере, в различных экономических областях и секторах: образование (по аналогии с виртуальными библиотеками больших образовательных центров Европы и не только - см. Система OLIS из Оксфордского Университета), системы здравоохранения, экономика, и т.д.

Рисунок 1. *Использование результатов*

Литература:

1. *Abell, A. A. and Oxbrow N.*, 2001, Competing with knowledge: The information professional in the Knowledge Management, Library Association Publishing, London.
2. *Benbya, H.*, 2008, Knowledge Management Systems Implementation: lesson from the Silicon Valley. Oxford, Chandos Publishing, Oxford, UK.
3. *Nishida, T.*, 2000, Dynamic Knowledge Interaction, CRC Press.
4. *Svage, M. C.*, 1996, Fifth Generation Management: Co-Creating Through Virtual Enterprising, Dynamic Teaming and Knowledge Networking, Butterworth-Heinmann, Boston, USA.
5. *Shukla, A., Srinivasan, R.*, 2003, Designing Knowledge Management Architecture: How to Implement Successful Knowledge Management programs, Sage Publications.

WEB AGRI-FOOD PLATFORM

[1]Simac V., [1]Macri A., [1]Dragancea B., [2]Cotora L.

[1] National Institute of Research&Development for Food Bioresources - IBA Bucharest, Interdisciplinary Research Compartment, Bucharest, Romania, e-mail: simacv@yahoo.com, viorel.simac@bioresurse.ro
[2] Integrator S.A., Bucuresti, Romania. e-mail: liviu.cotora@integrator-group.com

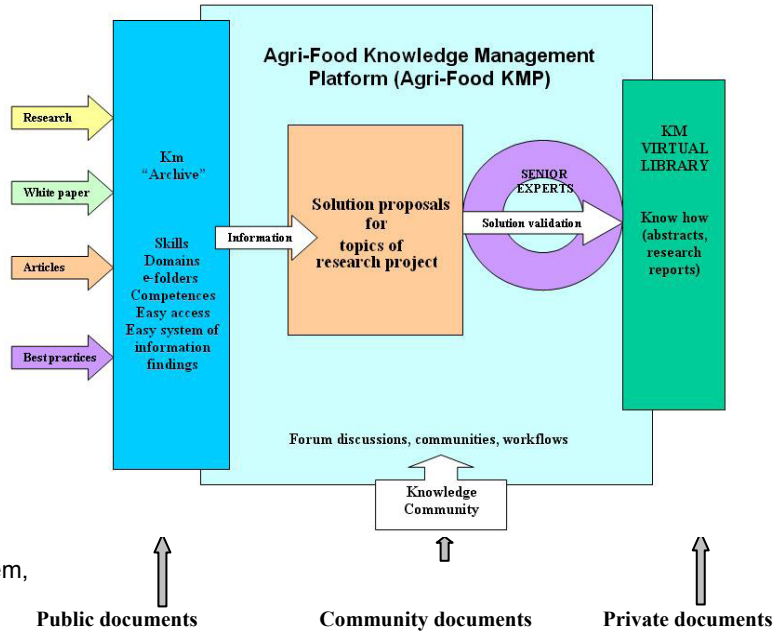
Knowledge Management is dealt with today, in the majority of the existing systems, as being based on a structured organization of the Best Practices, knowledge, information, competencies, expertise and partnerships concerning various fields, generically reunited as such under the concept of intangible values. These static systems have the drawback of creating the intangible values through processes and possibly, through procedures centered on the individual and not on the community and hence of creating a great amount of information stored at the individual's level, very probably redundant, with uncertain utility, relative accessibility and difficult, time consuming extraction. Furthermore, the lack of a common collaborative platform at the level of the communities involved in joint programs for the creation of knowledge represents a major hurdle in accomplishing a management of the knowledge, aligned to the strategies of the organization.

The main assumption of this web collaborative platform was the importance of knowing the current mechanisms, conditions and aspects of the production of knowledge, notwithstanding those related to the transfer and the utilization of the new knowledge and hence, extending the study of the connection between research and innovation as it is intermediated by the cooperation in R&D activity. One of the main results of the Agri-Food Knowledge Management Platform (Agri-Food KMP) consist of stimulating the participation in international research projects, the platform offer a comprehensive framework for the management of intangible values and an instrument for protecting the competitive and specific knowledge, with a maximization of the partnerships contributions and results.

Other results concerning the improvement of the performance of the intangible values are:

- capture and dissemination of the researchers' expertise;
- conservation of the knowledge base, within the context of experts leaving the institutes/organizations;
- stimulating the collaboration and value contribution of companies;
- improvement of the knowledge management process;
- a better administration of theintangible resources of the organization and monitoring their contribution to the fulfillment of the strategic objectives of the organization. Synthetically, the correlation between these results and their utility is presented in *picture 1*.

This research knowledge management system may be successfully implemented afterwards, besides the Agri-Food field, in various economic domains and sectors: education (similar to the virtual libraries of the great educational centers in Europe and not only - see the OLIS system of Oxford University), health system, economy, etc.



Pic. 1. Leveraging the Results

References:

1. *Abell, A. A. and Oxbrow N.,* 2001, Competing with knowledge: The information professional in the Knowledge Management, Library Association Publishing, London.
2. *Benbya, H.*, 2008, Knowledge Management Systems Implementation: lesson from the Silicon Valley. Oxford, Chandos Publishing, Oxford, UK.
3. *Nishida, T.,* 2000, Dynamic Knowledge Interaction, CRC Press.
4. *Svage, M. C.*, 1996, Fifth Generation Management: Co-Creating Through Virtual Enterprising, Dynamic Teaming and Knowledge Networking, Butterworth-Heinmann, Boston, USA.
5. *Shukla, A., Srinivasan, R.,* 2003, Designing Knowledge Management Architecture: How to Implement Successful Knowledge Management programs, Sage Publications.

БИОТЕХНОЛОГИИ В СФЕРЕ ОНКОЛОГИИ КАК ОБЪЕКТЫ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

Чехун В.Ф., Шепеленко И.В., Пятчанина Т.В., Дворщенко О.С.

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, Украина
e-mail:nonna@onconet.kiev.ua

Согласно Европейской патентной конвенции (EPC) “биотехнологическими изобретениями” являются изобретения, которые касаются продукта, состоящего из биологического материала, или содержат биологический материал, а также процесс, с помощью которого осуществляется производство биологического материала, переработка либо применение.

В последнее десятилетие изобретения именно по вопросам биотехнологий неизменно входят в десятку высокотехнических отраслей по количеству патентных заявок во всем мире, причем большая половина таких заявок поступает из научно-исследовательских институтов и университетов. В Украине количество заявок такого профиля также неуклонно возрастает. Это обусловлено несколькими причинами: во-первых, постоянно растущей интеграцией в мировую и, в первую очередь, Европейскую науку и экономику, а во-вторых, признанием на государственном уровне развития биотехнологий как одного из приоритетных направлений науки и техники.

Трудно переоценить вклад биотехнологических разработок в медицинскую отрасль, поскольку именно создание новых и/или усовершенствование существующих лекарственных препаратов и средств для диагностики (в особенности ранней и высокоточной) отвечает требованиям современного общества, нацеленного на преодоление наиболее опасных для жизни человека заболеваний и создание условий для его полноценного и гармонического развития через обеспечение высококвалифицированной и доступной медицинской помощи.

Такой подход исключительно актуален для онкологии, поскольку в настоящее время не удается существенно снизить или приостановить уровень заболеваемости и смертности от онкологических заболеваний. Создание новых способов ранней диагностики злокачественных новообразований (например, высокоспецифичные тест-системы) и развитие таких направлений как таргетная терапия, биотерапия, и введение в существующие схемы химиотерапии препаратов, полученных или модифицированных с помощью нанотехнологий, способствуют повышению эффективности диагностики и лечения, что приводит к снижению смертности, инвалидизации и повышению качества жизни онкологических больных.

Вместе с тем, именно такие разработки и представляют собой современные объекты интеллектуальной собственности (ОИС) в сфере биотехнологий, защита которых требует исключительно профессионального и взвешенного подхода. Общепринятой практикой для медицины вообще и для онкологии в частности является получение разрешительных документов для применения в клинике результатов научных разработок. Сроки на регистрацию новых препаратов Фармакологическим комитетом весьма продолжительны, ибо включают периоды доклинической и клинической апробации нового средства. При этом получение патента на изобретение такой биотехнологии занимает несколько лет. На данном этапе развития рыночных отношений в Украине в условиях последствий мирового экономического кризиса реализация таких ОИС, с точки зрения прямого их введения в производство даже при наличии профессионально составленных бизнес-планов, исключительно затруднена и наблюдается крайне редко. Поэтому многие патентовладельцы биотехнологических изобретений вынуждены идти по пути продажи лицензий зарубеж крупным компаниям и фирмам. Первостепенную роль в этом вопросе играет наличие не столько национального украинского патента (действие такого охранного документа распространяется только в пределах нашей страны), а зарубежных, в первую очередь Европейского патентного ведомства (EPO), Патентного ведомства США и др. Принимая во внимание вторую фазу получения патента EPO — национальную, украинские изобретатели получают охранные документы, на основании которых они полноправно могут заключать в этих странах лицензионные договора, где их права будут соответственно защищены. Вместе с тем, проведение такого патентирования, кроме исключительно длительного (в ряде стран — до 10 лет), имеет еще один существенный недостаток — высокая стоимость процедуры. Практически 90% патентов на изобретения в области биотехнологий получены как результат проведенных научно-исследовательских работ НИИ или университетами, финансируемыми из государственного и/или местного бюджетов, где затраты на подобные мероприятия по защите ОИС не предусмотрены. В связи с этим прослеживается негативная закономерность: количество лицензионных договоров, защищенных международными патентами, является ничтожно малым. В подавляющем большинстве отечественные разработки продаются зарубеж по заниженным ценам, и их авторы остаются незащищенными перед недобросовестными конкурентами, что, к сожалению, рассматривать можно лишь с моральной, а не с процессуальной стороны. Такие примеры, наверняка, типичны не только для изобретений, касающихся биотехнологий в онкологии, где именно такого рода разработки и составляют основу новейших подходов для улучшения диагностики и лечения, т.е. в конечном итоге повышения качества жизни пациентов, но характерны и для всей медико-биологической отрасли в целом.

В связи с вышеизложенным, на наш взгляд, в настоящее время необходимо внести изменения в законодательно-нормативную базу Украины касательно защиты ОИС в сфере биотехнологий через введение механизма создания режима наибольшего государственного благоприятствования правовому и финансовому обеспечению международного патентирования и заключения лицензионных договоров.

BIOTECHNOLOGICAL INVENTIONS IN ONCOLOGY AS INTELLECTUAL PROPERTY OBJECTS

Chekhun V.F., Shepelenko I.V., Piatchanina T.V., Dvorshchenko O.S.

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
e-mail:nonna@onconet.kiev.ua

According to the European Patent Convention (EPC) "biotechnological inventions" are inventions which concern a product consisting of the biological material or containing biological material, as well as the process by which the production of biological material, processing or use is performed.

Worldwide in the last decade the inventions on biotechnology are always among the ten high-tech industries by number of patent applications, with more than half of these requests come from research institutes and universities. In Ukraine, the number of applications of such a profile is also growing steadily. This is due to several reasons: firstly, the growing integration into the world and, above all, European science and economy, and secondly, recognition at the state level, the development of biotechnology as one of the priority areas of science and technology.

It is difficult to overestimate the contribution of biotechnology developments in the medical sector, because just construction new and/or improvement of existing medicines and diagnostic tools (particularly, early and highly precision) meets the requirements of modern society, aimed at overcoming human most life-threatening diseases and creation the conditions for individual full and harmonious development through the provision of qualified and accessible health care.

Such approach is extremely relevant to oncology, as currently it still not possible to reduce or suspend the cancer morbidity and mortality substantially. Creating new ways of malignant neoplasms early diagnosis (e.g., highly specific test systems) and development of such tracks as targeted therapy, biotherapy, as well as introduction into existing chemotherapy regimens the drugs derived/modified using nanotechnology, result in more efficient diagnosis and treatment, which leads to mortality and disability reduction and life quality enhancement in cancer patients.

At the same time, such developments represent modern intellectual property objects (IPO) in the field of biotechnology, which protection requires extremely professional and balanced approach. Common practice for medicine in general and oncology in particular is obtaining authorization permitting documents for clinical use of the research results. Terms for registration of new drugs by Pharmacological Committee are very long, because include the periods of pre-clinical and clinical testing. While obtaining the patent for the invention of such biotechnology takes few years. At the given stage of development of market relations in Ukraine in the aftermath of the global economic crisis, the implementation of such IPO, in terms of their direct introduction into production even in the presence of professional business plans, is extremely difficult and exceptionally rare. Therefore, many patent holders of biotechnological inventions are forced to follow the path of selling licenses to foreign companies and firms. Primary role in this matter plays not the presence of the Ukrainian national patent (the effect of such protection document applies only within our country) but foreign patents received from first of all European Patent Office (EPO), the U.S. Patent Office and others. Taking into consideration the second phase of EPO patenting – a national, Ukrainian inventors receive protection documents on which they rightfully could conclude license agreements in these countries, where their rights will be protected respectively. At the same time, conducting of such patenting, except long-term (in some countries – up to 10 years), has one more very significant disadvantage – the high cost of the procedure. Almost 90% of patents in biotechnological field are obtained as a result of the scientific research, held in universities or research institutes, funded by state and/or local budgets, where the costs of such measures to protect the the IPO are not provided. In connection with this negative pattern it can be traced: the number of license agreements, that are protected by international patents, is negligible. The vast majority of domestic developments are sold abroad at artificially low prices, and their authors remain vulnerable to unscrupulous competitors; that, unfortunately, can be viewed only from a moral, rather than the procedural side. Such cases, certainly, are typical not only for inventions relating to biotechnological patents in oncology, where exactly such kind of developments form the basis for innovative approaches to improve diagnosis and treatment, that is finally improve the patients' life quality, but they also typical for the entire medical and biological field as a whole.

In connection with the above mentioned, actually changes are required in legal and regulatory framework of Ukraine concerning the IPO protection in the field of biotechnology through the introduction of mechanism for establishing the most favored state legal-and-financial support for international patenting and license agreements signing.

СПИСОК АВТОРОВ

Абакумова О.С. 475
Абдо М. 629
Абдувалиев А 499
Абдулахад К.Ф. 433
Абдулкафарова Е.Р. 263
Абдулладжанова Н.Г. 233
Абдулладжанова Н.Г. 235
Абдулладжанова Н.Г. 237
Абдулладжанова Н.Г. 305
Абдулладжанова Н.Г. 307
Абдулладжанова Н.Г. 287
Авдеенко А.П. 5
Авдєєва Л.Ю. 209
Авдєєва Л.Ю. 333
Авидзба Ю.Н. 511
Агабеков В.Е. 217
Агуреев А.П. 761
Азарова О.В. 423
Айзенберг В.Л. 345
Албантова А.А. 425
Албулов А.И. 519
Александрова Г.А. 219
Алексеев К.С. 99
Алексеева И.В. 607
Алексеева О.М. 425
Алехин Е.К. 109
Алєксєєва І.В. 575
Алиев О.И. 591
Алиева С.Р. 383
Алиновская В.А. 221
Алиновская В.А. 223
Алмакаева Л.Г. 131
Аль-Окби Х.М. 371
Аль-Хаммаш Н. 505
Андреева Е.П. 7
Андрейченко С.В. 523
Андрущенко О.Л. 239
Андрущенко О.Л. 241
Андрюшина Е.С. 9
Аникина Л.В. 93
Аникина Л.В. 91
Аникина Л.В. 95
Анисимова Н.В. 337
Анисимова Н.Н. 89
Анисович М.В. 303
Анисович М.В. 635
Антоненко Л.А. 363
Антонюк С.И. 367
Апуховська Л.І. 427
Аретинская Т.Б. 365
Аретинская Т.Б. 321
Артеменко А.Ю. 709
Атаманюк В.П. 607
Афонин В.Ю. 303
Афонин В.Ю. 635
Афонин В.Ю. 533
Бабаева А.Г. 309
Бабан В.М. 467
Бабан В.М. 463
Бабий Л.В. 25
Бабкин В.А. 243
Багдашкин А.Л. 87
Бадун Г.А. 11
Бадун Г.А. 13
Бадун Г.А. 281
Баклаушев В.П. 663
Балынская Е.В. 663
Бальон Я.Г. 429
Бальтас М. 185
Баля А.Г. 25
Баранов В.В. 93
Баранов В.В. 91
Баранов В.В. 95
Барановський В.С. 35
Барба Н.А. 39
Барштейн В.Ю. 363
Барышева Т.С. 679
Басченко Н.Ж. 617
Басченко Н.Ж. 457
Батагова Ф.Э. 477
Бачурина Г.П. 355
Бджола В.Г. 203
Бевз О.В. 125
Бегунова Н.В. 131
Бежан Н.А. 257
Безуглова Г.Н. 447
Безусяк А.І. 449
Бейрахова К.А. 347
Бекиш А.В. 15
Беккерман А.М. 483
Белаш Д.Ю. 225
Белозерская Т.А. 351
Белозерская Т.А. 355
Белоконь В.Н. 481
Белоусов Ю.А. 17
Белоусов Ю.А. 135
Белоусова Т.А. 17
Белюга О.Г. 127
Белюга О.Г. 159
Белявская Л.А. 735
Беляев С.А. 221
Беляева О.А. 431
Берегова Т.В. 435
Берегова Т.В. 611
Береговая Т.В. 433
Береговая Т.В. 648
Береговая Т.В. 613
Береснева Ю.В. 499
Берник О.О. 435
Беспалова И.Г. 437
Бессараб Г.І. 461
Бидюкова Г.Ф. 245
Бийцева А.В. 19
Билец И.В. 367
Бильдюкевич А.А. 415
Бильдюкевич А.В. 339
Бильдюкевич А.В. 340
Бильдюкевич Т.Д. 21
Бинюков В.И. 425
Бисько Н.А. 363
Битютская О.Е. 565
Бісько Н.А. 357
Бобик В. 677
Бобровская Д.Л. 277
Бобык В. 583
Богатина Н.И. 701
Богатина Н.И. 725
Богатырева Е.О. 437
Богданова О.А. 481
Богун Л.І. 615
Богуцька К.І. 439
Бойко И.И. 219
Болтнева Н.П. 129
Бондаренко Н.С. 441
Бондаренко О.Б. 443
Бондаренко С.П. 127
Бондарь В.В. 565
Борзенко І.О. 573
Борисенко А.В. 345
Борисова Т. 261
Боровский Г.Б. 757
Бородулин В.Б. 585
Бородуля О.В. 371
Бражко О.А. 445
Бражко О.А. 57
Бражко О.О. 445
Брановицкая Т.Ю. 297
Броварец В.С. 25
Броварец В.С. 77
Броварець В.С. 207
Броварець В.С. 525
Брушков А.В. 353
Брюханов В.М. 423
Брюханов В.М. 489
Бугина Л.М. 247
Буко В.У. 563
Булавка А.В. 595
Буланцева Е.А. 731
Булко О.В. 373
Бульмага В.П. 359
Бурлака А.П. 607
Бурлакова Е.Б. 703
Бурлакова Е.Б. 721
Бурлакова Е.Б. 425
Бута А.З. 695
Бутрим Н.С. 21
Бутрим С.М. 21
Быркэ М.С. 41
Бычкова А.А. 273
Бычковский П.М. 221
Бычковский П.М. 223
Вадзюк О.Б. 77
Важничая Е.М. 551
Вакула С.И. 337
Валиева А.Р. 191
Ван Стаден Р.И. 39
Варбанец Л.Д. 607
Варфоломеев В.Н. 447
Василевский Д.А. 23
Василевська В.М. 449
Василенко А.Н. 25
Василенко А.П. 27
Василенко О.М. 31
Василенко О.М. 33
Васильев А.Н. 145
Васильченко А.В. 607
Васильченко О.В. 575
Васюк В.А. 293
Вахитова Ю.В. 191
Векліч Т.О. 651
Велиев М.Г. 383
Велиева Д.С. 113
Великий М.М. 449
Великий М.М. 427
Вербиненко А.В. 493
Вербова Ю.М. 131
Вервес Е.В. 29
Веселкина О.С. 451
Весельський С.П. 463
Весельський С.П. 291
Виеру В.В 41
Викторов И.В. 663
Викторов Н.Б. 451
Винников А.И. 453
Виноградова В.И. 137
Вихарев Ю.Б. 93
Вихарев Ю.Б. 95
Вихарев Ю.Б. 91
Вищук О.С. 249
Вовк А.И. 687
Вовк А.И. 25
Вовк М.В. 695
Войтенко З.В. 185
Войтенко З.В. 79
Войтенко З.В. 101
Войтенко Л.В. 293
Войцицький В.М. 555
Войцицький В.М. 605
Воловенко Ю.М. 193
Воловенко Ю.М. 213
Воловенко Ю.Н. 539
Воловненко Т.А. 193
Воловненко Т.А. 539
Володин В. В. 409
Володин В.В. 253
Володин В.В. 251
Володина С. О. 409
Володина С.О. 251
Володина С.О. 253
Волошина А.Д. 161
Вольф Ж. 111
Ворнику З.Н. 325
Воробець З.Д. 545
Воробьева А.М. 455
Воронин Е.Ф. 27
Воронкова О.С. 453
Воронова Т.Д. 647
Выгера С.М. 755
Габдрахманова С.Ф. 457
Габдрахманова С.Ф. 601
Габчак А.Л. 27
Гаджилы Р.А. 153
Газиева Г.А . 91
Газиева Г.А . 95
Галаєв О.І. 31
Галаєв О.І. 33
Галатенко Н.А. 9
Галенко Т.Г. 599
Галковська Г.В. 571
Гальченко С.Е. 437
Гальченко С.Е. 309
Гамма Т.В. 338
ГанжаО.Б. 605
Ганул В.Л. 491
Гаразд М.М. 31
Гаразд М.М. 137
Гаразд М.М. 159
Гаразд М.М. 33
Гаразд Я.Л. 33
Гаранович И.М. 329
Гарманчук Л.В. 571
Генчева В.І. 57
Герасимов Н.Ю. 721
Гергелюк Т.С. 577
Гесслер Н.Н. 351
Гесслер Н.Н. 355
Гетман И.А. 99
Гильдиева М.С. 499
Гильманова А.Г. 109
Гиндуллина Т.М. 167
Гиниятуллин Р.Х. 161
Глебов Е.К. 123
Гоголь С.В. 493
Голик Н.Ю. 459
Головач Т.Н. 763
Головко Ю. 315

Головко Ю. 259
Головнева Н.А. 413
Головченко Л.А. 23
Головченко О.В. 525
Голощапов А.Н. 721
Голощапов А.Н. 425
Голуб А.А. 49
Голуб А.А. 431
Голуб Н.В. 221
Голуб Н.В. 223
Голуб О.А. 541
Голубева М.Г. 441
Гончарова Н.Г. 461
Гордиенко О.В. 19
Горенко З.А. 463
Горина О.Л. 471
Горичко М.В. 175
Горохов В.В. 87
Горячая О.В. 267
Гошовська Ю.В. 465
Грахов В.П. 239
Грахов В.П. 241
Грива Г.И. 353
Гриднев Е.А. 477
Гриненко Н.Ф. 663
Гринько В.Н. 415
Грицай О.Б. 653
Гришко В.В. 385
Гришковец В.И. 225
Грищенко В.А. 555
Грищенко Л. 141
Грищенкова О.О. 473
Грищук Б.Д. 35
Грінченко О.А. 467
Гроза Н.В. 355
Громозова Е.Н. 707
Гроховская Т.Ч. 469
Гроховская Т.Ч. 505
Грудько І.В. 263
Груша М.М. 655
Гулевский А.К. 471
Гулевський О.К. 473
Гулевський О.К. 475
Гуліч М.П. 37
Гуліч М.П. 357
Гуля А.П. 39
Гуля А.П. 41
Гуля А.П. 43
Гулякевич О.В. 45
Гулякевич О.В. 47
Гулякевич О.В. 63
Гулякевич О.В. 197
Гуринович В.А. 11
Гуринович Т.А. 155
Гущина О.В. 371
Гюльахмедова С.А. 113
Давиденко Н.А. 49
Давидовська Т.Л. 685
Давыдова Н.К. 51
Далимов Д.Н. 237
Данилович А.В. 657
Данилович Ю.В. 657
Данильченко С.Н. 75
Датиева Ф.С. 477
Датиева Ф.С. 479
Дворщенко К.О. 611
Дворщенко К.О. 435
Дворщенко О.С. 767
Де П. 185
Демешко О.Д. 311
Демид Д.И. 569
Демченко Е.М. 481
Демченко Т.В. 597
Денисламова Е.С. 53
Деревянчук М.В. 659
Деримедведь Л.В. 353
Дерябина В.И. 55
Дерябина В.И. 283
Джелдубаева Е.Р. 625
Джур С. В. 359
Дзюба В.Н. 565
Дикусар Е.А. 151
Дикусар Е.А. 153
Діденко Г. В. 605
Діденко Г.В. 541
Дмитриева Е.А. 405
Дмитруха Н.М. 527
Добродуб І.В. 57
Добыш И.И. 569
Домаш В.И. 533
Домнина Н.С. 591
Донченко Г.В. 483
Донченко Г.В. 321
Донченко Г.В. 687
Донченко Г.В. 449
Дородникова Е.А. 355
Доценко О.И. 485
Драговоз И.В. 733
Драговоз И.В. 735
Драпайло А. Б. 549
Дрогущенко Е.О. 607
Дрэганча Б. 765
Дубей І.Я. 59
Дубей Л.В. 59
Дубова Л.Г. 593
Дубынин В.А. 653
Дудченко Т.И. 491
Дуніч А.А. 291
Дурнова Н.А. 585
Дюбко Т.С. 443
Дюбко Т.С. 309
ДюбкоТ.С. 487
Дядюн С.Т. 607
Евтушенков А.Н. 411
Егоров О.А. 373
Егорова А.С. 351
Елисеева М.А. 675
Емельянова А.А. 642
Еникеев Р.Р. 61
Енина О.Л. 245
Ермакова Т.С. 557
Ермолович Ю.В. 197
Ермолович Ю.В. 63
Есипов Р.С. 347
Ефимова М. В. 675
Ефимова М.В. 661
Ефремова Н. 361
Ефремова Н.В. 359
Єгорова Т.В. 185
Єгорова Т.В. 101
Ємченко Н.Л. 37
Єфремова В.А. 553
Жабинский В.Н. 63
Жабинский В.Н. 197
Жабинский В.Н. 199
Жабинский В.Н. 619
Жавнерко Г.К . 179
Жалбэ А.Б. 41
ЖалбэА.В. 39
Жариков А.Ю. 489
Жаркевич И.Л. 340
Жаркевич И.Л. 339
Жаркова Л.Д. 607
Жебракова И.В. 569
Желдакова Р.А. 387
Желдакова Р.А. 143
Железняк Т.Г. 325
Желтоножская Т. 141
Желтухин Н.К. 165
Желтухина Г.А. 65
Жеребкер К.Я. 67
Жигачева И.В. 703
Жмакова Н.А. 327
Жовнир В.А. 455
Жук В.В. 741
Жук І.В. 739
Жук О.І. 737
Жук О.Н. 643
Жукова И.А. 569
Жукова Н.Д. 642
Жукова Я.Ф. 239
Жуковская Н.А. 153
Жукотський Е.К. 209
Жукотський Е.К. 333
Журавель Е. 583
Забело О.И. 303
Заботин А.И. 679
Завгородній М.П. 57
Завгородній М.П. 445
Завелевич М.П. 581
Завелевич М.П. 607
Завелевич М.П. 575
Загоскина Н.В. 743
Зайцев С.Л. 491
Зайцева Н.В. 255
Закашун Т.Е. 9
Залєток С.П. 493
Зарудий Ф.С. 457
Зверев Я.Ф. 489
Зверев Я.Ф. 423
Зверева Т.Д. 151
Зверева Т.Д. 153
Зеленый С. 583
Зенкова М.А. 353
Зима И.Г. 495
Зимичев А.В. 61
Злыгостева М.В. 95
Зобов В.В. 497
Зобов В.В. 161
Золотарева Е.К. 418
Золотарева Е.К. 419
Золотарь Р.М. 151
Зубенко Ю.С. 151
Зубенко Ю.С. 155
Зубенко Ю.С. 187
Зубенко Ю.С. 387
Ибрагимов Ф.А. 499
Ибрагимова С.А. 745
Иванов А.А. 345
Иванов И.С. 501
Иванов О.И. 533
Иванова А.А. 131
Иванова Н.А. 457
Иванова О.А. 109
Иванова Т.С. 363
Ившина И.Б. 385
Иловайский А.И. 117
Иловайский А.И. 119
Ильина Л.В. 567
Ильина Т.В. 267
Ильянок Г.А. 569
Исмаилова Г.О. 69
Исхакова Г.Ф. 191
Ищенко В.В. 71
Ільїна Т.В. 263
Кабальнова Н.Н. 105
Кавсан В.М. 663
Кадуцкий А.П. 73
Казбанов В.В. 155
Казючиц О.А. 569
Калалб Т.И. 257
Калачёва Т.А. 665
Калачова Т.А. 697
Калашніков А.В. 427
Каленова Л.Ф. 353
Калечиц Г.В. 143
Калечиц Г.В. 387
Калинкевич А.Н. 75
Калинкевич О.В. 75
Калінін І.В. 503
Калугина А.А. 647
Кальченко В.І. 549
Калюжная О.В. 375
Камаев Ф.Г. 233
Камаев Ф.Г. 235
Камаев Ф.Г. 237
Канунникова Н.П. 505
Каплуненко В.Г. 365
Каплуненко В.Г. 37
Каплуненко В.Г. 357
Капустян Л. 677
Капустян Л. 583
Капустян Л.Н. 491
Капустян Л.Н. 455
Каражия В. 259
Каражия В. 315
Каралкин П.А. 197
Карбовська Л.С. 463
Кардаш О.Ф. 533
Кардаш О.Ф. 635
Кардаш О.Ф. 303
Карнаушенко О.В. 493
Карначук Р.А. 661
Касенкова Т.А. 89
Касимова Л.В. 277
Катковская И.Н. 11
Катюшина О.В. 338
Качала В.В. 67
Кашпур Н.В. 263
Кваско Е.Ю. 285
Квач М.В. 187
Квач М.В. 189
Квач М.В. 230
Кесарев О.Г. 165
Кибирев В.К. 77
Ким Ю.А. 425
Кинтя П.К. 289
Кинтя П.К. 335
Кириенко Е.В. 87
Кириллова М.Е. 283
Кирко С.Н. 563
Киселева Т.А. 9
Киселева Ю. В. 705
Киселица Н. 261
Киселица О. 261
Кисель А.И. 79
Кізуб І.В. 507
Кладиев А.А. 221
Клевета Г. 509
Клен Е.Э. 109
Кленов О.О. 493
Клепко А.В. 523
Клецков А.В. 155
Клецков А.В. 151

Климнюк С.І. 35
Кляйн О.И. 281
Kolesnikov Ya.S. 674
Ковалева А.М. 267
Ковалева А.М. 511
Коваленко Е.И. 515
Коваленко Н. 83
Коваленко Н. К. 285
Коваленко Н.А. 269
Коваленко Н.В. 213
Коваленчик И.Л. 579
Ковалишин В.В. 157
Коваль Г.М. 169
Ковальова А.М. 263
Ковальова А.М. 265
Ковальова В.А. 513
Ковальський Д.Б. 695
Ковтун И.С. 661
Кожемяка М.А. 646
Козак М.М. 333
Козаченко А.П. 77
Козаченко О.П. 207
Козачкова О.М. 623
Козин Ю.И. 487
Козира С.А. 271
Козира С.А. 279
Колесников Я.С. 667
Колесников Я.С. 673
Колмыкова Т.С. 745
Колодяжна О.О. 81
Колодяжная О.О. 85
Колодяжный О.И. 85
Колодяжный О.И. 81
Коломиец О.В. 657
Колотилова О.И. 338
Кольтовер В.К. 517
Колячкина С.В. 99
Комаров Б.А. 519
Комаров И.В. 175
Комисаренко А.Н. 511
Комиссарова Н.Г. 617
Комісаренко А.М. 265
Комісаренко С.В. 427
Компанець І.В. 521
Кондратова Ю.А. 523
Кондратюк К.М. 525
Коновалов А. И. 715
Коновалов А. И. 705
Коновалов А.И. 717
Коновалов А.И. 711
Коновалова Н.В. 87
Коновалова С.А. 5
Конон А.Д. 367
Конон А.Д. 369
Константинов А.И. 281
Коптева Н.И. 89
Копылова Г.Н. 441
Копытов Ю.П. 225
Кораблева Н.П. 731
Корда А.В. 635
Кордюм Е.Л. 701
Коренман Я.И. 273
Коренман Я.И. 275
Коренман Я.И. 299
Коренюк И.И. 338
Корж Е.Н. 225
Коркач Ю.П. 669
Коркач Ю.П. 465
Корнева Е.С. 375
Корнет М.М. 445
Коробков В.И. 281
Королева О.В. 281
Короленко Т.К. 527
Коротаева Н.Е. 757
Корчинська Л.В. 529
Корчинська Л.В. 531
Косик О.І. 317
Косинов М.В. 365
Косінов М. В. 357
Косінов М.В. 37
Костеневич А.А. 407
Костерін С.О. 621
Костерова Р.И. 223
Костерова Р.И. 221
Костіна В.Г. 575
Костюк А.С. 728
Костюк О. М. 215
Костюк О.М. 201
Котора Л. 765
Коцюруба А.В. 669
Кошовий О.М. 265
Кравец А.В. 277
Кравец В.С. 673
Кравец В.С. 665
Кравец В.С. 667
Кравец В.С. 659
Кравець В.С. 671
Кравець В.С. 689
Кравець В.С. 697
Кравцов А.К. 675
Кравченко А.Н. 91
Кравченко А.Н. 93
Кравченко А.Н. 95
Кравченко А.Н. 705
Кравченко В.Н. 459
Крамарьов С.М. 747
Крамор Р.В. 633
Красинько В.О. 345
Красненкова Т.П. 533
Красненкова Т.П. 635
Кременцова А.А. 425
Кретинин С.В. 659
Кретинин С.В. 667
Кретинин С.В. 673
Кретинин С.В. 665
Кретинін С.В. 697
Кривандин А.В. 425
Кривов'яз А.О. 169
Кривовяз А.А. 97
Кривошапко О.Н. 535
Кривошапко О.Н. 537
Кривошеев Д.М. 99
Кривошеева О.А. 275
Крикун С.О. 101
Кришталь О.О. 695
Круподерова Т.А. 363
Крупська І. 677
Крыжановский С.А. 495
Крылова И.О. 95
Кубасов В.А. 567
Кудрявцев К.В. 103
Кузмитович Е. А. 15
Кузнецов В.В. 661
Кузнецов В.В. 675
Кузнецова Г.Н. 539
Кузьменко О.П. 541
Кулагіна М.А. 279
Кулагіна М.А. 271
Кулаева О.Н. 675
Кулай И.В. 193
Кулибекова Т.Н. 113
Кулик Н.В. 161
Куликова Н.А. 281
Курамшина А.Р. 105
Курман П.В. 45
Курман П.В. 121
Курченко И.Н. 345
Курчий Б.А. 733
Курьянов В.О. 389
Кухаренко О.П. 207
Кухтенко О.С. 265
Кучин А.В. 633
Кучмеровская Т.М. 321
Лаврова К.В. 571
Лагутіна О.С. 527
Лазовская О.И. 329
Лампатов В.В. 423
Лампатов В.В. 489
Ларкина Е.А. 371
Ларская И.А. 679
Лахвич Ф.А. 107
Лахвич Ф.А. 139
Лахтадир О. І. 215
Лахтадир О.І. 201
Лебедев Е.В. 183
Лёвин А.А. 371
Левков І.В. 101
Лендел В.Г. 97
Лендєл В.Г. 169
Леонидов Н.Б. 543
Леонова Н.О. 735
Леонтьев В.Н. 329
Леонтьев В.Н. 269
Леонтьев В.Н. 337
Лесик Р.Б. 31
Лёшина Л.Г. 373
Липко И.А. 375
Лисиця А.В. 749
Листван К.В. 377
Листунов Д.П. 213
Литвин Д.И. 491
Литвиновская Р.П. 659
Лихванцева В.Г. 347
Личковська Н.Е. 545
Літюга В.В. 573
Лобанок А.Г. 397
Лозан-Тыршу К.С. 43
Ломин С.Н. 99
Лопатина Л.А. 155
Лопатина Т.В. 601
Лотоцька О.Ю. 449
Лузина Е.Л. 547
Лук'янова Н.Ю. 549
Луканина Ю.К. 633
Лукашев Н.В. 717
Лукашевич В.С. 643
Лукашук О.І. 525
Лукиенко Е.П. 469
Лукиенко Е.П. 505
Лукьяненко И.В. 707
Луценко Р.В. 551
Лысенко И.Л. 15
Любченко Г.А. 685
Ляхов А.М. 681
Maksin V.I. 366
Makovetska L.I. 606
Mamedov E.Sh. 114
Mavlyanov S. M. 308
Mavlyanov S.M. 306
Мавлянов С.М. 233
Мавлянов С.М. 235
Мавлянов С.М. 237
Мавлянов С.М. 287
Мавлянов С.М. 69
Мавлянов С.М. 305
Мавлянов С.М. 307
Мазьєр М.Р. 185
Макай Ш. 637
Макара В.А. 145
Макара Н.С. 601
Макара Н.С. 617
Макаренко О.М. 553
Макарова Е.И. 379
Макарова Н.Л. 327
Макарова Н.Н. 109
Макарова О.О. 449
Макарчук М.Ю. 529
Маковейчук Т.І. 737
Маковецька Л. І. 605
Макота О. 111
Макри А. 765
Максимович Я.С. 615
Максимюк О.П. 695
Максин В.И. 365
Малашко Л.І. 493
Малеванная Н.Н. 717
Малиновская Л.А. 283
Мамедов Э.Ш. 113
Маменко Т.П. 683
Маракулина К.М. 633
Мардас Д.К. 645
Мардас Д.К. 643
Мартінец Я. 689
Мартыненко Ю.В. 15
Мартынюк В.С. 709
Мартынюк В.С. 707
Мартынюк В.С. 719
Мартынюк В.С. 723
Мартынюк О.А. 167
Марченко А.А. 335
Марьянкова Р.Ф. 569
Масагутова Э.М. 711
Масливец А.Н. 53
Матвеева Н.А. 285
Матвеева Н.А. 323
Матюшов В.Ф. 183
Махаева Г.Ф. 599
Махаева Г.Ф. 129
Махмудов Р.Р. 287
Махмудов Р.Р. 53
Махова Н.Н. 95
Мащенко Н.Е. 289
Мегалинская А.П. 363
Медведева Е.Н. 243
Медведева Н.И. 601
Медведева С.М. 115
Мединська К.О. 631
Меленевська Н.В. 685
Мельничук Д.О. 555
Меркулова В.М. 117
Меркулова В.М. 119
Меркулова Е.П. 585
Метелиця Л.О. 525
Мехтиев А.Р. 197
Милохов Д.С. 193
Миль Е.М. 425
Миня И.И. 607
Миронова Г.П. 644
Митропольська Н.Ю. 357
Мифтахова А.Ф. 205
Михайличенко О.Н. 5
Михайлов А.С. 161
Михайлов Н.В. 71
Михайлов С.Н. 99

Михайлова Л.П. 559
Михайлова Р.В. 557
Михайлова Р.В. 311
Михальчук А.Л. 121
Михальчук А.Л. 47
Михальчук А.Л. 45
Мишарин А.Ю. 197
Міліневська В.О. 493
Мінченко П.Г. 439
Мірошниченко М.С. 685
Мірошниченко М.С. 531
Мітюхін О.П. 525
Міщенко Л. Т. 291
Могилевич С.Е. 681
Моисеева Н.Н. 471
Моісєєва Н.М. 475
Мойбенко О.О. 609
Мойсеенок А.Г. 579
Мойсеенок А.Г. 11
Мойсеенок А.Г. 505
Мокросноп В.М. 418
Мокшина Н.Я. 273
Мокшина Н.Я. 275
Мокшина Н.Я. 299
Молодой Е. 361
Молчан О.В. 381
Молчан О.В. 393
Мороз И.В. 557
Мороз Ю. В. 643
Морозова Е.В. 569
Москвина В.С. 123
Москвина В.С. 79
Моспанова Е.В. 125
Мруг Г.П. 127
Музычка Л.В. 29
Музычка Л.В. 171
Мурадов П.З. 383
Муринов Ю.И. 105
Муртазина Л.И. 711
Муртазина Л.И. 717
Мусатенко Л.І. 293
Мусієнко М.М. 739
Мусієнко М.М. 741
Мухамадиева Г.Р. 129
Набиуллин А.Р. 179
Назарова Е.С. 131
Нардид О.А. 561
Нартикоева М.И. 477
Нарута Е.Е. 563
Наумова Г.В. 327
Небольсин В.Е. 65
Непийвода Х.Д. 571
Непорада К.С. 433
Нечай М.П. 133
Нешта В.В. 431
Никандров В.Н. 645
Никандров В.Н. 643
Никиташина А.Д. 497
Никитина И.Л. 205
Никитина И.Л. 109
Никитченко Ю.В. 565
Никитюк И.Е. 567
Никишин Г.И. 117
Никишин Г.И. 119
Николаев А.Е. 161
Николаева Д. 259
Николаева Д. 315
Николаева И.А. 563
Николаевич Е.С. 569
Николаевич Л.Н. 569
Никольский Е.Е. 497
Никулина И.Г. 375
Нифталиев С.И. 299
Ніколаєнко Т.В. 571
Нікольченко А.Ю. 475
Новик А.М. 607
Ноговицина Е.М. 385
Ноздренко Д. М. 529
Ноздренко Д.М. 439
Ноздренко Д.М. 531
Носач Л.В. 27
Носач Л.Н. 301
Нурищенко Н.Є. 573
Нурищенко Н.Є. 631
Оболенская М.Ю. 607
Оводов Ю.С. 587
Овчинникова Т.Ф. 327
Огороднийчук А.С. 137
Огороднійчук О.С. 159
Огороднійчук О.С. 33
Окороченков С.А. 65
Октябрьский О.Н. 395
Октябрьский О.Н. 603
Олениченко Н.А. 743
Олехнович Л.С. 245
Ольховик В.К. 387
Ольховик В.К. 23
Ольховик В.К. 143
Омельчук Е.А. 345
Омельянчик С.Н. 505
Онисько П.П. 195
Орлов А.В. 617
Орловський О.А. 493
Осадчук Т.В. 77
Осипов В.И. 743
Осипова Е.Ю. 135
Остапченко Л.І. 521
Остапченко Л.І. 611
Остапченко Л.І. 637
Остапченко Л.І. 435
Остапченко Л.І. 595
Остапчук А.М. 377
Остринська О.В. 207
Островская Г.В. 539
Остроухова Л.А. 243
Отурина И.П. 389
Отурина И.П. 379
Очкур О.В. 263
Павлова Т.П. 711
Павлючок-Гогерчак О.В. 295
Пальчиковская Л.И. 607
Пальчиковська Л. Г. 575
Панов Д.А. 297
Папченкова Г.А. 391
Парфенова В.В. 375
Пархоменко Ю.М. 687
Пархоменко Ю.М. 483
Патрикей С.Ю. 137
Пахомова О.А. 299
Пахонцу Е. 39
Пашкевич С.Г. 642
Пашковский Ф.С. 139
Пащенко В.З. 87
Пелюх Л.І. 631
Перепелицына Е.М. 577
Перминова И.В. 281
Пермякова Н. 141
Петкевич С.К. 155
Петкевич С.К. 153
Петраш В.В. 567
Петрищев Н.Н. 451
Петрищев Н.Н. 451
Петров К.А. 497
Петров П.С. 177
Петров П.Т. 569
Петушок В.Г. 143
Петушок Н.Э. 579
Пехньо В.І. 623
Пеховская Т.А. 579
Пеховская Т.А. 505
Пивоваренко В.Г. 181
Пивоваренко Ю.В. 145
Пирог Т.П. 367
Пирог Т.П. 369
Пироговская Г.В. 751
Пискорская Н.Г. 495
Платонов М.О. 575
Плетнева М.В. 147
Плотников М.Б. 501
Плотников М.Б. 591
Плюснина С.Н. 633
Плявник Н.В. 147
Повница О.Ю. 301
Погожих О.Г. 473
Погорелов М.В. 75
Погорельская Л.В. 519
Погребной П. 583
Погребной П.В. 491
Погрібний П.В. 59
Погуляева И.А. 255
Подогова М. 259
Покотило І.В. 689
Полтавская О.А. 285
Полуконова Н.В. 585
Полукошко Е.Ф. 645
Полухин Е.Л. 149
Поляк Э.А. 713
Попильниченко С.В. 77
Попільніченко С.В. 525
Попов А. М. 535
Попов А. М. 537
Попов А.В. 547
Попов П.Л. 589
Попов С.В. 587
Попова Е.В. 591
Попович А.С. 565
Посохов Н.Ф. 487
Потапов А.Ю. 149
Потебня Г.П. 541
Поткин В.И. 151
Поткин В.И. 153
Поткин В.И. 155
Поткин В.И. 23
Поткин В.И. 387
Преображенська Т.Д. 637
Преображенська Т.Д. 595
Прибытько И.Ю. 433
Прокопенко В.В. 157
Прокопенко В.В. 681
Прокопенко В.В. 525
Прохорова А.О. 555
Проценко М.А. 731
Прошин А.Н. 593
Прошин А.Н. 7
Пылина Я.И. 251
Пытлев С.И. 303
Пятчанина Т.В. 767
Раваева М.Ю. 627
Радченко Е.А. 49
Радченко Є.О. 541
Радько О.В. 271
Радько О.В. 279
Раєцька Я.Б. 595
Рассукана Ю.В. 195
Ратнікова С.Д. 159
Рахимов Р. Н. 307
Рахимов Р.Н. 305
Рахметов Д.Б. 241
Рахметов Д.Б. 239
Резник В.С. 161
Резник В.С. 497
Реліна Л.І. 473
Репин В.Е. 353
Рибалко С.Л. 575
Рогожин А.А. 497
Рогоза Л.А. 309
Родинский А. Г. 597
Родинский А.Г. 481
Родионов А.Н. 67
Родионов А.Н. 135
Рожко О. 677
Рожко О.Т. 491
Рожнова Р.А. 9
Розанова Е.Д. 561
Розанова С.Л. 561
Рокитко П.В. 323
Романенко А.В. 655
Романов Г.А. 691
Романов Г.А. 667
Романов Г.А. 673
Романов Г.А. 99
Романовская В.А. 323
Романтеева Ю.В. 585
Ромашко С.Н. 393
Ромашко С.Н. 381
Рубинов Д.Б. 107
Рубинова И.Л. 107
Рудакова Е.В. 599
Руденко И.В. 19
Рудик В.Ф. 43
Руднева И.И. 301
Рудниченко Ю.А. 643
Ружицкий А.О. 731
Русин І.Ф. 169
Рыбалко С.Л. 607
Рыбальченко В.К. 539
Рыжкина И. С. 715
Рыжкина И. С. 705
Рыжкина И.С. 717
Рыжкина И.С. 711
Рябенко Д. 583
Рясний В.М. 427
Савченкова Л.В. 125
Савчук О.М. 435
Сагач В.Ф. 669
Сагач В.Ф. 465
Салихов Ш.И. 233
Салихов Ш.И. 235
Самойленко О.А. 493
Самойлова З.Ю. 395
Самойлова З.Ю. 603
Самонина Г.Е. 613
Самонина Г.Е. 441
Сандомирский Б.П. 437
Сандомирский Б.П. 309
Сапожникова Т.А. 601
Сапожникова Т.А. 457
Сапунова Л.И. 397
Сапунова Л.И. 411
Сапунова Л.И. 407
Сафаралиева З.С. 113
Сафиуллин Р.Л. 227
Сафронова Г.В. 399
Сахаутдинова Р.А. 227

Семашко Т.В. 311
Семенкевич В.Н. 340
Семенкевич В.Н. 339
Семенкевич Н.Г. 339
Семенкевич Н.Г. 340
Семенов А.В. 177
Семенов В.Э. 161
Семенова Е.В. 177
Семерня Л.Г. 371
Сербін А.Г. 271
Сербін А.Г. 279
Сергеева О.Ю. 591
Сергеенко Н.В. 319
Серебренникова Г.А. 147
Серебряный А.М. 731
Середа О.В. 291
Серков И.В. 593
Серков И.В. 7
Сернов Л.Н. 165
Сибірна Н. 509
Сидехменова А.В. 501
Сидора Н.В. 511
Сидоренко М.В. 577
Сидоренко О.В. 313
Сидорик Л. 677
Сидорик Л. 583
Сидорик Л.Л. 693
Сидорик Л.Л. 455
Сидорик Л.Л. 491
Сидякин А.И. 379
Симак В. 315
Симак В. 765
Симак В. 259
Сименел А. 163
Сименел А.А. 67
Сименел А.А. 135
Синиця А.Д. 195
Синюгін А.Р. 203
Сімуров О.В. 429
Скачилова С.Я. 165
Скляр А.М. 75
Скочко А.Б. 369
Скрипец В.И. 5
Слепченко Г.Б 55
Слепченко Г.Б. 167
Сливка М.В. 169
Сливка М.В. 97
Сливка М.В. 169
Смалій Р. В. 215
Смалій Р.В. 201
Смирнова Г.В. 603
Смирнова Г.В. 395
Смирнова И.М. 245
Смірнов О.Є. 317
Смолий О.Б. 171
Смолий О.Б. 29
Снегур Л.В. 173
Собко В.М. 719
Соколик О.А. 487
Соколов В.Б. 129
Солдаткина М. 583
Соліляк З. 509
Соловйов А.І. 507
Солохин С.А. 275
Сорокіна Л. В. 605
Софілканич А.П. 369
Софрони Л.В. 39
Софрони Л.В. 41
Спиридович Е.В. 319
Спиридович Е.В. 329
Стародубцева М.Н. 515
Старосила Д.Б. 607
Старосила Д.Б. 575
Степаненко С.П. 687
Степанов С.С. 419
Степанов Ю. В. 513
Степанова Е.В. 347
Степанова Е.В. 281
Степанова Л.І. 555
Стойко В.И. 345
Страшный В.В. 345
Стрижак А.В. 175
Стрижак И.В. 644
Строцька Є.А. 595
Струтинський Р.Б. 609
Сукач В.А. 695
Супиченко Г.Н. 269
Супрун С.М. 321
Супрун С.М. 345
Сухарев Ю.С. 401
Суховія М.І. 295
Суходуб Л.Ф. 75
Сухомлінов В.М. 461
Сухомлінова І.Є. 461
Сырчин С.А. 345
Сытова М.В. 405
Тагаева И.Р. 479
Талабаев М.В. 155
Талипов С.А. 69
Тараров В.И. 99
Тарасова И.В. 177
Тарнавський С.С. 203
Татульченков М.Ю. 179
Таширев А.Б. 323
Темурьянц Н.А. 728
Тимошева А.П. 717
Тимощук В.В. 181
Тимощук В.В. 159
Тимчук К.С. 325
Тихонова Н.Г. 635
Ткачёв В.И. 753
Ткачевская Е.П. 371
Ткаченко Я.В. 455
Ткачук В.А. 19
Ткачук Т.М. 213
Тодор І.М. 623
Толстов А.Л. 183
Томачинська Л.І. 513
Томсон А.Э. 327
Топалэ Л. 261
Топалэ Л. 361
Торгало Л.О. 611
Трач Ю. 111
Трескунов К.А. 519
Трещенкова Ю. А. 721
Треьякова И.О. 455
Трибрат Н.С. 627
Трокоз В.А. 403
Трокоз В.А. 365
Трушина В.А. 573
Туманянц К.Н. 728
Тумилович М.К. 643
Турлюк Д.В. 303
Турманидзе Д.Г. 647
Тясто З.А. 11
Украинец И.В. 125
Украинец И.В. 459
Уланович Л.И. 431
Улащик Е.А. 187
Уліщенко Є.О. 445
Умарова Б.А. 441
Усатый А. 361
Усатый А. 261
Усубалиева Г.М. 663
Фадеев М.А. 447
Фалалеева Т.М. 613
Фам Кам Ньунг 55
Фаткова Н.Н. 753
Фафула Р.В. 545
Федевич О.М. 455
Федоров Б.С. 447
Федорова Г.А. 375
Федорченко Ю.М. 747
Федоряк О.Д. 127
Фенько Л.А. 340
Фенько Л.А. 339
Феськова Е.В. 337
Филимонова Н.Б. 495
Филиппович С.Ю. 355
Фильченков А.А. 581
Фильченков А.А. 607
Флюрик Е.А. 329
Фомина М.Н. 389
Фомич М.А. 189
Фрасинюк М.С. 127
Фридланд С.В. 711
Фулга Л. 361
Хаецкий И.К. 607
Халиуллин Ф.А. 191
Халиуллин Ф.А. 109
Халиуллин Ф.А. 205
Ханило Л.С. 515
Харенко Е.Н. 405
Харкевич Е.С. 321
Харченко О.І. 615
Хетагурова Л.Г. 477
Хетагурова Л.Г. 479
Хижняк С.В. 555
Хижняк С.В. 605
Хиля В.П. 123
Хиля В.П. 133
Хиля В.П. 71
Хиля В.П. 79
Хиля О.В. 193
Хисамутдинова Р.Ю. 617
Хисамутдинова Р.Ю. 601
Хілько Т.Д. 637
Хо Ши Линь 55
Ховака В.В. 291
Хоменко А.В. 449
Хомутник Я.Я. 195
Хохла М. 509
Храмов В.С. 177
Хрипач В.А. 197
Хрипач В.А. 199
Хрипач В.А. 619
Хрипач В.А. 63
Хрипач В.А. 661
Хрипач В.А. 659
Хрипач Н.Б. 199
Хусаинов Д.Р. 338
Цавловский Д.В. 199
Цапко М. 83
Цапков В.И. 43
Цапков В.И. 41
Цапков В.И. 39
Царик Н.В. 623
Цветкова Е.А. 281
Цвылев О.П. 405
Цейслер Ю.В. 709
Цимбалюк О.В. 621
Цимбалюк О.В. 723
Цимбалюк О.В. 685
Цирюк Е.И. 433
Цыбульский Д.А. 230
Чайка В.О. 521
Чайка Я. 509
Чайковська О. О. 215
Чайковська О.О. 201
Чарочкина Л.Л. 157
Часовский К.С. 455
Чеботаренко С. 261
Чеботаренко С. 361
Чеканов М.О. 203
Чемирис А.Й. 646
Чепик О.П. 151
Черенок С.О. 549
Черетаев И.В. 338
Черкасова Л.В. 407
Черная А.Н. 407
Чернинский А.А. 495
Чернов А.Н. 155
Чернова Т.А. 46
Чернова Т.А. 47
Чернова Т.А. 48
Чернова Т.А. 45
Чернышева М.Г. 11
Чернышева М.Г. 13
Чернышева М.Г. 281
Чеховская Л.И. 687
Чехонин В.П. 663
Чехун В.Ф. 623
Чехун В.Ф. 767
Чехун В.Ф. 549
Чехун В.Ф. 637
Чиж Н.А. 309
Чихман О.М. 331
Чмелева С.И. 297
Чокырлан А. 259
Чорный С.А. 687
Чукичева И.Ю. 633
Чумак П.Я. 755
Чумаченко С.А. 77
Чуян Е.Н. 625
Чуян Е.Н. 627
Чуян Е.Н. 728
Шабалина Ю.В. 205
Шабликін О.В. 207
Шаблыкин О.В. 77
Шаблыкина О.В. 71
Шадрин Д. М. 409
Шайда В.Г. 301
Шанайда М.І. 341
Шандрик М.М. 315
Шарафутдинов Р.М. 205
Шарипов И.М. 191
Шаркова Н.О. 209
Шаркова Н.О. 333
Шаталова О.В. 425
Шатирова М.И. 383
Шафрановская Е.В. 629
Шафрановская Е.В. 635
Швед А.Д. 575
Швец С.А. 335
Шевцова Е.Ф. 593
Шевченко А.Е. 513
Шевченко В.Б. 145
Шевченко О.Г. 633
Шейкина Н.В. 725
Шейкина Н.В. 701
Шелеметьева О.В. 167
Шелест Д.В. 513
Шелюк О.В. 631
Шепеленко И.В. 767

Шеремет А.А. 565
Шерман Е.Д. 711
Шестопалова А.В. 211
Шибирин О.В. 127
Шибряева Л.С. 425
Шигарова А.М. 757
Шилін С.В. 133
Шилов В. В. 635
Шилов В.В. 303
Шилов В.В. 533
Шилова Е.В. 165
Шиманська Т.В. 465
Шиманський І.О. 427
Шихалиев Х.С. 115
Шихалиев Х.С. 149
Шихалиев Х.С. 89
Шишкина Е. 83
Шишкина Е.О. 213
Шишкина Л.Н. 633
Шишлянникова А.А. 269
Шишлянникова Т.А. 375
Шкляев Ю.В. 53
Шкрабак О.А. 651
Шляховенко В.О. 493
Шляхотко Е.А. 411
Шманай В.В. 179
Шманай В.В. 189
Шманай В.В. 230
Шманай В.В. 187
Шоба В.М. 695
Шпак Е.Г. 541
Шпильова С.І. 623
Штиль Н. А. 215
Штиль Н.А. 201
Штолько В.Н. 447
Шуба Н.М. 647
Шульце Б. 111
Шурхай С. Ф. 327
Шутова А.Г. 217
Шутова А.Г. 319
Шутова А.Г. 269
Шутова А.Г. 329
Шутова Т.Г. 217
Щенявський І.Й. 475
Щепина Н.Е. 219
Щетинская И.И. 561
Щетинский М.И. 561
Щетко В.А. 413
Элинсон М.Н. 117
Элинсон М.Н. 119
Юдина Н.Д. 55
Юнусов М.С. 617
Юнусов М.С. 601
Юрин В.М. 381
Юрин В.М. 393
Юркштович Н.К. 223
Юркштович Т.Л 221
Юркштович Т.Л. 223
Юркштович Т.Л. 21
Юрченко О. О. 215
Юрченко О.О. 201
Юрченко С. О. 215
Юрченко С.О. 201
Ягольник Е.А. 425
Ягубова Г.Г. 383
Язловицкий А.В. 137
Якимович И.В. 415
Якимович Н.Н. 415
Яковенко Л. 677
Яковенко Л.Ф. 455
Яковенко О.М. 697
Яковенко О.Н. 665
Яковишин Л.А. 225
Яковлев Р.Ю. 543
Якубцова І.В. 637
Якупова Л.Р 227
Яніш Ю.В. 493
Янкович С.И. 125
Янковський Д.С. 611
Яремчук И.О. 171
Ярмолюк С.М. 203
Яровой И.Р. 225
Ярош А.К. 481
Ярошенко Е.А. 753
Ярошенко О.А. 683
Ященко О.В 357

AUTHOR LIST

Abakumova O.S. 476
Abdo M. 630
Abdulahad K.F. 434
Abdulkafarova E.R. 264
Abdulladjanova N. G. 308
Abdulladjanova N.G. 234
Abdulladjanova N.G. 236
Abdulladjanova N.G. 238
Abdulladjanova N.G. 288
Abdulladjanova N.G. 306
Abduvaliev A.A. 500
Afonin V. 636
Afonin V.Y. 304
Afonin V.Y. 534
Agabekov V.E. 218
Agureev A.P. 762
Aisenberg V.L. 346
Albantova A.A. 426
Albina Pisani 727
Albulov A.I. 520
Aldo Calandri 727
Alekhin E.K. 110
Alekseeva I.V. 608
Alekseeva O.M. 426
Alexandrova G.A. 220
Alexeev C.S. 100
Alexeeva I.V. 576
Al-Hammashi N. 506
Aliev O.I. 592
Alinovskaya V.A. 222
Alinovskaya V.A. 224
Aliyeva S.R. 384
Almakaeva L.G. 132
Al-Okbi H.M. 372
Andre C. 79
Andre C. 80
Andreeva E.P. 8
Andreychenko S.V. 524
Andrjushina Ye.S. 10
Andruschenko O.L. 240
Andrushchenko O.L. 242
Anikina L.V. 94
Anikina L.V. 92
Anikina L.V. 96
Anisimova N.N. 90
Anisovich M. 636
Anisovich M.V. 304
Anton M. 641
Antonenko L.A. 364
Antonyuk S.I. 368
Apukhovska L.I. 428
Aretinska T.B. 366
Aretinskaya T.B. 322
Arrault A. 19
Arrault A. 20
Artemenko O.Yu. 710
Atamaniuk V.P. 608
Avdeenko A.P. 6
Avdyeyeva L.Yu 334
Avdyeyeva L.Yu. 210
Avidzba Yu.N. 512
Azarova O.V. 424
Baban V.M. 464
Baban V.M. 468
Babayeva A.G. 310
Babij L.V. 26
Babkin V.A. 244
Bachurina G.P. 356
Badun G.A. 12
Badun G.A. 14
Badun G.A. 282
Bagdashkin A.L. 88
BaklaushevV.P. 664
Baltas M. 186
Balya A.G. 26
Balynska O.V. 664
Balyon Ya. G. 430
Baranov V.V. 94
Baranov V.V. 92
Baranov V.V. 96
Baranovskyy V.S. 36
Barba N.A. 40
Barisheva T.S. 680
Barshteyn V.Yu. 364
Baschenko N.J. 618
Baschenko N.J. 458
Batagova F.E. 478
Bdzhola V.G. 204
Begunova N.V. 132
Bejan N. 258
Bekish A.V. 16
Bekkerman A.M. 484
Belash D.Yu. 226
Belokon V.N. 482
Belousov Yu.A. 18
Belousov Yu.A. 136
Belousova T.A. 18
Belozerskaya T.A. 352
Belozerskaya T.A. 356
Beluga O.G. 128
Belyaeva O.A. 432
Belyev S. M. 222
Belyuga O.G. 160
Beregova T.V. 614
Beregova T.V. 434
Beregova T.V. 436
Beregova T.V. 612
Beresneva Yu.V. 500
Bernyk O. O. 436
Bespalova I.G. 438
Bessarab G.I. 462
Besusyak A.I. 450
Bevz O.V. 126
Beyrakhova K.A. 348
Bezuglova G.N. 448
Bidyukova G. F 246
Biitseva A.V. 20
Bil'dyukevich T.D. 22
Bildyukevich A.A. 416
Bilets I.V. 368
Biliavska L.O. 736
Bilimaga V. P. 360
Binyukov V.I. 426
Birca M.S. 42
Bisko N.A. 358
Bisko N.A. 364
Bituytskaya O.Ye. 566
Bobrovskaya D.L. 278
Bobyk M. 584
Bobyk V. 678
Bogatina N. I. 702
Bogatina N.I. 726
Bogatyreva E.O. 438
Bogdanova O.A. 482
Bogun L.I. 616
Bogutska K.I. 440
Boiko I.I. 220
Boltneva N.P. 130
Bondar V.V. 566
Bondarenko N.S. 442
Bondarenko O.B. 444
Bondarenko S.P. 128
Borisenko A.V. 346
Borisova T. 262
Borodulin V.B. 586
Borodulya O.V. 372
Borovskii G.B. 758
Borzenko I.A. 574
Branovickaya T.Yu. 298
Brazhko A.A. 58
Brazhko O.A. 446
Brazhko O.O. 446
Brouchkov A.V. 354
Brovarets V.S. 26
Brovarets V.S. 208
Brovarets V.S. 78
Brovarets V.S. 526
Bryukhanov V.M. 424
Bryukhanov V.M. 490
Buhyna L. 248
Buko V.U. 564
Bukuru Hussein 639
Bulantseva E. A. 732
Bulko O.V. 374
Burlaka A.P. 608
Burlakova E.B. 704
Burlakova E.B. 722
Burlakova E.B. 426
Buta A.Z. 696
Butrim N.S. 22
Butrim S.M. 22
Bychkova A.A. 274
Bychkovsky P.M. 222
Bychkovsky P.M. 224
Calalb T. 258
Caragia V. 260
CaragiaV. 316
Cebotarenco S. 262
Cebotarenco S. 362
Chaika V.O. 522
Chaikovska O. O. 216
Chaikovska O.O. 202
Charochkina L.L. 158
Chasovsky K. 456
Chayka Ya. 510
Chekanov M.O. 204
Chekhonin V.P. 664
Chekhovskaya L.I. 688
Chekhun V.F. 624
Chekhun V.F. 768
Chekhun V.F. 550
Chekhun V.F. 638
Chepik O.P. 152
Cherenok S.O. 550
Cherkasova L.V. 408
Chernaya A.M. 408
Cherninskiy A.A. 496
Chernov A.N. 156
Chernysheva M.G. 12
Chernysheva M.G. 14
Chernysheva M.G. 282
Chiselita N. 262
Chiselita O. 262
Chizh N.A. 310
Chmeleva S.I. 298
Chomenko A.V. 450
Chornyy S.A. 688
Chukicheva I.Yu. 634
Chumachenko S.A. 78
Chumak P.Ya. 756
Chuyan E.N. 626
Chuyan E.N. 628
Chykhman O.M. 332
Ciocarlan A. 260
Cotora L. 766
Dalimov D.N. 238
Danilchenko S.N. 76
Danylovych G.V. 658
Danylovych Yu V. 658
Datiyeva F.S. 478
Datiyeva F.S. 480
Davidenko N.A. 50
Davidovska T.L. 686
Davydova N.K. 52
De P. 186
Demchenko E.M. 482
Demchenko T.V. 598
Demeshko O.D. 312
Demid D.I. 570
Denislamova E.S. 54
Derevyanchuk M.V. 660
Derimedved L.V. 354
Derjabina V. I. 284
Deryabina V.I. 56
Diadiun S.T. 608
Didenko G.V. 542
Didenko G.V. 606
Dikusar E.A. 152
Dikusar E.A. 154
Dileep Kumar 640
Dmitrieva E.A. 406
Dmytrukha N.M. 528
Dobrodub I.V. 58
Dobysh I.I. 570
Domash V.I. 534
Domnina N.S. 592
Donchenko G.V. 484
Donchenko G.V. 322
Donchenko G.V. 688
Donchenko G.V. 450
Dorodnikova E.A. 356
Dotsenko O.I. 486
Dragancea B. 766
Dragovoz I.V. 734
Dragovoz I.V. 736
Drapaylo A.B. 550
Droguschenko E.O. 608
Dubey I.Ya. 60
Dubey L.V. 60
Dubova L.G. 594
Dubynin V.A. 654
Dudchenko T. 492
Dunich A.A. 292
Dur S. V. 360
Durnova N. 586
Dvorchenko K.O. 436
Dvorschenko K.O. 612
Dvorshchenko O.S. 768
Dyubko T.S. 488
Dyubko T.S. 444
Dyubko T.S. 310
Dzheldubaeva E.R. 626
Dzyuba V.N. 566
Efimova M.V. 662
Efimova M.V. 676
Efremova N. 362
Efremova N.V. 360
Efremova V.A. 554
Egorova A.S. 352
Elinson M.N. 118
Elinson M.N. 120
Eliseeva M.A. 676
Enikeev R.R. 62
Enina O. L. 246

Ermolovich Yu.V. 198
Ermolovich Yu.V. 64
Esipov R.S. 348
Evtushenkov A. 412
Fadeev M.A. 448
Fafula R.V. 546
Falalyeyeva T.V. 614
Fatkova N.N. 754
Fedevich O. 456
Fedorchenko Yu.N. 748
Fedorov B.S. 448
Fedorova G.A. 376
Fedoryak O.D. 128
Filimonova N.B. 496
Filippovich S.U. 356
Flyurik E.A. 330
Fomich M.A. 190
Fomina M.N. 390
Frasynuk M.S. 128
Fridlan S.V. 712
Fulga L. 362
Gabchak A.L. 28
Gabdrahmanova S.F. 602
Gabdrakhmanova S.F. 458
Galatenko N.A. 10
Galayev O.I. 32
Galayev O.I. 34
Galchenko S.E. 438
Galchenko S.E. 310
Galenko T.G. 600
Galkovska G.V. 572
Ganul V. 492
Ganzha O.B. 606
Garanovich I.M. 330
Garazd M.M. 32
Garazd M.M. 138
Garazd M.M. 160
Garazd M.M. 34
Garazd Y.L. 34
Garmanchuk L.V. 572
Gazieva G.A . 92
Gazieva G.A . 96
Gencheva V.I. 58
Gerasimov N.Y. 722
Gergeliuk T.S. 578
Gessler N.N. 352
Gessler N.N. 356
Getman I.A. 100
Ghazaleh Ghavami 349
Ghazaleh Ghavami 350
Gildieva M.S. 500
Gilmanova A.G. 110
Gindullina T.M. 168
Giniyatullin R.Kh. 162
Glebov E.K. 124
Gogol' S.V. 494
Golik N.Yu. 460
Goloshapov A.N. 426
Goloshchapov A.N. 722
Golovach T.N. 764
Golovchenko L.A. 24
Golovchenko O.V. 526
Golovco Ju. 316
Golovco Ju. 260
Golovnyova N.A. 414
Golub A.A. 50
Golub A.A. 432
Golub N.V. 222
Golub N.V. 224
Golub O.A. 542
Golubeva M.G. 442
Goncharova N.G. 462
Gorenko Z.A. 464
Gorichko M.V. 176
Gorina O.L. 472
Gorohov V.V. 88
Goryacha O.V. 268
Goshovska Y.V. 466
Grakhov V.P. 242
GrakhovV.P. 240
Gridnev Ye.A. 478
Grinchenko O.A. 468
Grinenko N.Ph. 664
Grischenko L. 142
Grishko V.V. 386
Grishkovets V.I. 226
Gritsay O.B. 654
Griva G.I. 354
Grohovskaya T.Ch. 506
Gromozova E.N. 708
Groza N.V. 356
Grusha M.M. 656
Grydko I.V. 264
Gryschenkova O.O. 474
Gryshchenko V.A. 556
Gryshchuk B.D. 36
Gulakhmedova S.A. 114
Gulea A.P. 40
Gulea A.P. 42
Gulea A.P. 44
Gulevsky O.K. 472
Gulevsky O.K. 474
Gulevsky O.K. 476
Gulich M.P. 358
Gulich M.P. 38
Gulyakevich O.V. 46
Gulyakevich O.V. 48
Gulyakevich O.V. 64
Gulyakevich O.V. 198
Gurinovich T.A. 156
Gurinovich V.A. 12
Gushchina O.V. 372
Hajili R.A. 154
Hanilo L.S. 516
Hemant K. Gautam 417
Ho Sy Linh 56
Hordiyenko O.V. 20
Hovaka V.V. 292
Hrakhouskaya T.Ch. 470
Hryn'ko V.N. 416
Iakovenko O. M. 698
Iakovenko O.M. 666
Ibragimov F.A. 500
Ibragimova S.A. 746
Iegorov O.A. 374
Il'yanok G.A. 570
Ilovaisky A.I. 118
Ilovaisky A.I. 120
Ilyina L.V. 568
Ilyina T.V. 264
Ilyina T.V. 268
Ishchenko V.V. 72
Iskhakova G.F. 192
Ismailova G.O. 70
Ivanov A.A. 346
Ivanov I.S. 502
Ivanov O.A. 534
Ivanova A.A. 132
Ivanova N.A. 458
Ivanova O.A. 110
Ivanova T.S. 364
Ivshina I.B. 386
Jalba A.B. 42
Jalba A.V. 40
Jamart-Gregoire B. 19
Jamart-Gregoire B. 20
Kabal'nova N.N. 106
Kachala V.V. 68
Kadutskii A.P. 74
Kal'chenko V.I. 550
Kalachova T.A. 666
Kalachova T.A. 698
Kalashnikov A.V. 428
Kalechyts G.V. 144
Kalechyts G.V. 388
Kalenova L.F. 354
Kalinin I.V. 504
Kalinkevich A. N. 76
Kalinkevich O.V. 76
Kaluzhnaya O.V. 376
Kamaev F.G. 238
Kamaev F.G. 234
Kamaev F.G. 236
Kanunnikova N.P. 506
Kaplunenko V.G. 366
Kaplunenko V.G. 38
Kaplunenko V.G. 358
Kapustian L. 678
Kapustian L. 492
Kapustian L. 584
Kapustian L. 456
Karalkin P.A. 198
Karbovska L.S. 464
Kardash V. 636
Kardash V.F. 534
Kardash V.F. 304
Karnachuk R.A. 662
Karnaushenko O.V. 494
Kasenkova T.A. 90
Kashpur N.V. 264
Kasimova L.V. 278
Kastsianevich A.A. 408
Katkovskaya I.N. 12
Kavalenka A.I. 516
Kavsan V.M. 664
Kazakova O.B. 602
Kazbanov V.V. 156
Kazyuchits O.A. 570
Kesarev O.G. 166
Khaetskii I.K. 608
Khaliullin F.A. 192
Khaliullin F.A. 110
Khaliullin F.A. 206
Kharchenko O.I. 616
Kharenko E.N. 406
Kharkevich E.S. 322
Khetagurova L.G. 478
Khetagurova L.G. 480
Khilko T.D. 638
Khilya O.V. 194
Khilya V.P. 124
Khilya V.P. 134
Khilya V.P. 72
Khilya V.P. 80
Khisamutdinova R.J. 602
Khisamutdinova R.Y. 618
Khohkla M. 510
Khomutnyk Y.Y. 196
Khramov V.S. 178
Khripach N.B. 200
Khripach V.A. 198
Khripach V.A. 200
Khripach V.A. 620
Khripach V.A. 64
Khripach V.A. 662
Khripach V.A. 660
Khyzhnyak S.V. 556
Khyzhnyak S.V. 606
Kibirev V.K. 78
Kim Yu.A. 426
Kintya P.K. 290
Kintya P.K. 336
Kirienko E.V. 88
Kirillova M. E. 284
Kirko S.N. 564
Kiseleva T.A. 10
Kiseleva Yu.V. 706
Kizub I.V. 508
Kladiev A.A. 222
Klein O.I. 282
Klen E.E. 110
Klenov O.O. 494
Klepko A.V. 524
Kletskov A.V. 156
Kletskov F.V. 152
Kleveta G. 510
Klymniuk S.I. 36
Kolesnikov Ya.S. 668
Kolmykova T.S. 746
Kolodiazhna O. O. 86
Kolodiazhna O.O. 82
Kolodiazhnyi O. I. 86
Kolodiazhnyi O.I. 82
Kolomiets O.V. 658
Koltover V.K. 518
Kolyachkina S.V. 100
Komarov B.A. 520
Komarov I.V. 176
Komisarenko A.M. 266
Komisarenko S.V. 428
Komissarenko A.N. 512
Komissarova N.G. 618
Kompanets I.V. 522
Kondratova Yu.A. 524
Kondratyuk K.M. 526
Konon A.D. 368
Konon A.D. 370
Konovalov A.I. 716
Konovalov A.I. 718
Konovalov A.I. 712
Konovalova A.I. 706
Konovalova N.V. 88
Konovalova S.A. 6
Konstantinov A.I. 282
Kopteva N.I. 90
Kopylova G.N. 442
Kopytov Yu.P. 226
Korableva N. P. 732
Korchynska L. 530
Korchynska L. 532
Korda A. 636
Kordyum E.L. 702
Korenman Ya.I. 276
Korenman Ya.I. 300
Korenman Ya.I. 274
Korkach Yu. P. 670
Korkach Yu.P. 466
Kornet M.M. 446
Korneva E.S. 376
Korobkov V.I. 282
Korolenko T.K. 528
Koroleva O.V. 282
Korotayeva N.E. 758
Korzh E.N. 226
Koshevoy O.M. 266
Kosinov M.V. 38
Kosinov M.V. 366
Kosinov M.V. 358
Kosterin S.O. 622
Kosterova R.I. 224
Kosterova R.I. 222
Kostina V.G. 576
Kostyuk O.M. 202
Kostyuk O.M. 216
Kosyk O. 318
Kotsuruba A.V. 670
Koval' G.M. 170
Kovalenchik I.L. 580
Kovalenko N. 84
Kovalenko N. 270

Kovalenko N. K. 286
Kovalenko N.V. 214
Kovalishyn V.V. 158
Kovalskyy D.B. 696
Kovalyova A.M. 264
Kovalyova A.M. 266
Kovalyova A.M. 512
Kovalyova V. 514
Kovalyova A.M. 268
Kovtun I.S. 662
Kozachenko O.P. 208
Kozachenko O.P. 78
Kozachkova O.M. 624
Kozak M.M. 334
Kozin Yu.I. 488
Kozyra S.A. 272
Kozyra S.A. 280
Kramaryov S.M. 748
Kramor R.V. 634
Krasinko V.O. 346
Krasnenkova T. 636
Krasnenkova T.P. 534
Kravchenko A.N. 92
Kravchenko A.N. 94
Kravchenko A.N. 96
Kravchenko A.N. 706
Kravchenko V.N. 460
Kravets A.V. 278
Kravets V. S. 698
Kravets V.S. 672
Kravets V.S. 690
Kravets V.S. 666
Kravets V.S. 660
Kravets V.S. 674
Kravets V.S. 668
Kravtsov A.K. 676
Krementsova A.V. 426
Kretynin S.V. 668
Kretynin S.V. 674
Kretinin S.V. 660
Kretinin S.V. 666
Kretynin S. V. 698
Krishtal O.O. 696
Krivandin A.V. 426
Krivoshapko O. N 538
Krivoshapko O. N. 536
Krivosheev D.M. 100
Krivosheeva O.A. 276
Krizhanovskiy S.A. 496
Kroupskaya I. 678
Krupodorova T.A. 364
Krykun S.O. 102
Krylova I.O. 96
Kryvov'yaz A.A. 98
Kryvov'yaz A.A. 170
Kubasov V.A. 568
Kucharenko O.P. 208
Kuchmerovskaya T.M. 322
Kudryavtsev K.V. 104
Kukhtenko A.S. 266
Kulaeva O.N. 676
Kulagina M.A. 280
Kulagina M.A. 272
Kulay I.V. 194
Kulibekova T.N. 114
Kulik N.V. 162
Kulikova N.A. 282
Kuramshina A.R. 106
Kurchenko I.N. 346
Kurchii B.A. 734
Kurman P.V. 122
Kuryanov V.O. 390
Kusnetsov V. V. 676
Kusnetsov V.V. 662
Kutchin A.V. 634
Kuzmenko O.P. 542
Kuzmitovich Ya. A. 16
Kuznetsova G.M. 540
Kvach M.V. 188
Kvach M.V. 190
Kvasko E.J. 286
Kysil A.I. 80
Lagutina O.S. 528
Lahtadyr O. I. 216
Lahtadyr O.I. 202
Lakhvich F. A. 108
Lakhvich F.A. 140
Lampatov V.V. 424
Lampatov V.V. 490
Larkina E.A. 372
Larskaya I.A. 680
Lavrova K.V. 572
Lazovskaya O.I. 330
Lebedev E.V. 184
Lendel V.G. 98
Lendel V.G. 170
Leonidov N.B. 544
Leonova N.O. 736
Leontev V.N. 330
Leontiev V. 270
Lesyk R.B. 32
Lesyk R.B. 34
Levin A.A. 372
Levkov I.V. 102
Likhvantseva V.G. 348
Lioshina L.G. 374
Lipko I.A. 376
Listunov D.P. 214
Litvinovska R.P. 660
Lityuga V.V. 574
Lobanok A.G. 398
Lomin S.N. 100
Lopatina L.A. 156
Lopatina T.V. 602
Lototska O.U. 450
Lozan-Tirsu C.S. 44
Lukanina Yu.K. 634
Lukashev N. V. 718
Lukashuk O.I. 526
Lukiyenka A.P. 470
Lukiyenko H.P. 506
Lukyanenko I.V. 708
Lukyanova N.Yu. 550
Lutsenko R.V. 552
Luzina E.L. 548
Lyakhov A.M. 682
Lychkovska N.E. 546
Lysenko I.L. 16
Lystvan K. 378
Lysytsya A.V. 750
Lytvin D. 492
Lyubchenko G.A. 686
Macri A. 766
Mahmudov R.R. 288
Mahmudov R.R. 54
Makara N.S. 602
Makara N.S. 618
Makara V.A. 146
Makarchuk M. 530
Makarenko O.M. 554
Makarova E.I. 380
Makarova N.L. 328
Makarova N.N. 110
Makarova O.O. 450
Makay S. 638
Makhaeva G.F. 600
Makhaeva G.F. 130
Makhova N.N. 96
Makota O. 112
Makovejchuk T.I. 738
Maksymovych Ia.S. 616
Malashko L.I. 494
Malevannaya N.N. 718
Malinovskaja L.A. 284
Mamenko T. P. 684
Mar'yankova R.F. 570
Marakulina K.M. 634
Marchenko A.A. 336
Martinec J. 690
Martynenko Yu.V. 16
Martyniuk V.S. 724
Martynuk O.A. 168
Martynyuk V.S. 710
Martynyuk V.S. 708
Martynyuk V.S. 720
Mashchenko N.E. 290
Maslivets A.N. 54
Matvieieva N.A. 286
Matvieieva N.A. 324
Matyushov V.F. 184
Mavlyanov S.M. 234
Mavlyanov S.M. 236
Mavlyanov S.M. 238
Mavlyanov S.M. 288
Mavlyanov S.M. 70
Maximyuk O.P. 696
Mazieres M.R. 186
Medvedeva E.N. 244
Medvedeva N.I. 602
Medvedeva S.M. 116
Medynskaya K.A. 632
Megalinska A.P. 364
Mehtiev A.R. 198
Melenevska N.V. 686
Melnytchuk D.O. 556
Merkulova E. 586
Merkulova V.M. 118
Merkulova V.M. 120
Metelitsa L.O. 526
Miftakhova A.F. 206
Mikhailov A.S. 162
Mikhailov S.N. 100
Mikhailova L.P. 560
Mikhailova R.V. 558
Mikhailova R.V. 312
Mikhal'chuk A.L. 122
Mikhal'chuk A.L. 46
Mikhal'chuk A.L. 48
Mikhaylov N.V. 72
Milinevska V.O. 494
Mill E.M. 426
Milokhov D.S. 194
Minchenko P.G. 440
Minia I.I. 608
Miroshnichenko M.S. 686
Miroshnichenko M. 532
Misharin A.Yu. 198
Mishchenko L.T. 292
Mitropolska N.Yu. 358
Mityukhin O.P. 526
Mogilevich S.Ye. 682
Moiseenok A.G. 580
Moiseenok A.G. 12
Moiseenok A.G. 506
Moiseyeva N.M. 476
Moiseyeva N.M. 472
Mokshina N.Ya. 276
Mokshina N.Ya. 300
Mokshina N.Ya. 274
Molchan O.V. 382
Molchan O.V. 394
Molodoi E. 362
Moroz I.V. 558
Morozova E.V. 570
Moskvina V.S. 124
Moskvina V.S. 80
Mospanova E.V. 126
Moybenko O.O. 610
Mrug G.P. 128
Mukhamadieva G.R. 130
Muradov P.Z. 384
Murinov Y.I. 106
Murtazina L.I. 712
Murtazina L.I. 718
Musatenko L.I. 294
Musienko M. M. 740
Musienko M. M. 742
Muzychka L.V. 30
Muzychka L.V. 172
Mykhailychenko O.N. 6
Masagutova E. M. 712
Nabiullin A.R. 180
Nardid O.A. 562
Nartikoyeva M.I. 478
Naruta E.E. 564
Naumova G.V. 328
Nazarova E.S. 132
Nebolsin V.E. 66
Nechai M.P. 134
Nepiyvoda H.D. 572
Neporada K.S. 434
Neshta V.V. 432
Nicolaeva D. 260
Nicolaeva D. 316
Niftaliev S.I. 300
Nikishin G.I. 118
Nikishin G.I. 120
Nikitashina A.D. 498
Nikitchenko Yu.V. 566
Nikitina I.L. 206
Nikitina I.L. 110
Nikityuk I.E. 568
Nikolaenko T.V. 572
Nikolaev A.E. 162
Nikolaevich E.S. 570
Nikolaevich L.N. 570
Nikolayeva I.A. 564
Nikolchenko A.Yu. 476
Nikolsky E.E. 498
Nikulina I.G. 376
Nogovitsina Ye.M. 386
Nosach L.N. 302
Nosach L.V. 28
Novik A.M. 608
Nozdrenko D. 530
Nozdrenko D. 532
Nozdrenko D.M. 440
Nurishchenko N.E. 574
Nurishchenko N.Ye. 632
Obolenskaia M.Yu. 608
Ochkur O.V. 264
Ogorodniychuk O.S. 160
Ogorodniychuk O.S. 34
Ogorodniychuk O.S. 138
Okorochenkov S.A. 66
Oktyabrsky O.N. 396
Oktyabrsky O.N. 604
Olehnovich L.S. 246
Olenichenko N.A. 744
Olkhovik V.K. 388
Olkhovik V.K. 24
Olkhovik V.K. 144
Omelchuk E.A. 346
Omelyanchik S.N. 506
Onys'ko P.P. 196
Orlov A.V. 618
Orlovsky O.A. 494
Osadchuk T.V. 78
Osipova E.Yu. 136

Ossipov V.I. 744
Ostapchenko L.I. 436
Ostapchenko L.I. 522
Ostapchenko L.I. 596
Ostapchenko L.I. 612
Ostapchenko L.I. 638
Ostapchuk A. 378
Ostroukhova L.A. 244
Ostrovska G.V. 540
Ostrynska O.V. 208
Oturina I.P. 390
Oturina I.P. 380
Ovchinnikova T.F. 328
Ovodov Yu.S. 588
Pahontu E. 40
Pakhomova O.A. 300
Palchikovskaia L.I. 608
Palchykovska L.G. 576
Panov D.A. 298
Papchenkova G.A. 392
Parfenova V.V. 376
Parkhomenko Yu.M. 688
Parkhomenko Yu.M. 484
Paschenko V.Z. 88
Pashkovsky F.S. 140
Pasquale Avino 727
Patrykey S.Yu. 138
Pavlova T.P. 712
Pavlyuchok-Gogertchak O.V. 296
Pehovskaya T.A. 506
Pekhnyo V.I. 624
Pekhovskaya T.A. 580
Pelyuh L.I. 632
Perepelitsina E.M. 578
Perminova I.V. 282
Permyakova N. 142
Petkevich S.K. 156
Petkevich S.K. 154
Petrash V.V. 568
Petrescu M. 641
Petrishchev N.N. 452
Petrov K.A. 498
Petrov P.S. 178
Petrov P.T. 570
Petushok N.E. 580
Petushok V.G. 144
Pham Cam Nhung 56
Philchenkov A.A. 582
Philchenkov A.A. 608
Piatchanina T.V. 768
Pirahouskaya H. 752
Piskorskaya N.G. 496
Pivovarenko V.G. 182
Platonov M.O. 576
Pletneva M.V. 148
Plotnikov M.B. 502
Plotnikov M.B. 592
Plyavnik N.V. 148
Plyusnina S.N. 634
Podogova M. 260
Pogorel'skaya L.V. 520
Pogorelov M. V. 76
Pogozhikh O.G. 474
Pogrebnoy P.V. 60
Pogribnyi P. 492
Pogribnyy P. 584
Poguliaeva I.A. 256
Pokotylo I.V. 690
Poltavskaja O.A. 286
Polukhin E.L. 150
Polukonova N. 586
Polyak E.A. 714
Popilnichenko S.V. 78
Popil'nichenko S.V. 526
Popov A.M. 536
Popov A.M. 538
Popov A.V. 548
Popov P.L. 590
Popov S.V. 588
Popova E.V. 592
Popovich A.S. 566
Posokhov N.F. 488
Potapov A.U. 150
Potebnia G.P. 542
Potkin V.I. 152
Potkin V.I. 154
Potkin V.I. 156
Potkin V.I. 24
Potkin V.I. 388
Povnitsa O.Yu. 302
Preobrazhenska T.D. 596
Preobrazhenska T.D. 638
Prokchorova A.V. 556
Prokopenko V.V. 158
Prokopenko V.V. 682
Prokopenko V.V. 526
Proshin A.N. 594
Proshin A.N. 8
Protsenko M. A. 732
Prybytko I.Yu. 434
Pylina Y.I. 252
Pyrog T.P. 368
Pyrog T.P. 370
Pytlev S.I. 304
Pyvovarenko Yu.V. 146
Radchenko E.A. 50
Radchenko E.O. 542
Radko E.V. 272
Radko E.V. 280
Raetska Ya.B. 596
Rakhimov R. N. 308
Rakhimov R.N. 306
Rakhmetov D.B. 240
Rakhmetov D.B. 242
Rassukana Yu. V. 196
Ratnikova S.D. 160
Ravaeva M.Y. 628
Relina L.I. 474
Repin V.E. 354
Reznik V.S. 162
Reznik V.S. 498
Riasniy V.M. 428
Rodinskiy A.G. 482
Rodinsky A.G. 598
Rodionov A.N. 68
Rodionov A.N. 136
Rogoza L.A. 310
Rogozhin A.A. 498
Rokitko P.V. 324
Romanenko O.V. 656
Romanov G.A. 692
Romanov G.A. 100
Romanov G.A. 668
Romanov G.A. 674
Romanovskaya V.A. 324
Romanteeva Yu. 586
Romashko S.N. 394
Romashko S.N. 382
Rozanova E.D. 562
Rozanova S.L. 562
Rozhko O. 678
Rozhko O. 492
Rozhnova R. A. 10
Rubinov D.B. 108
Rubinova I.L. 108
Rudakova E.V. 600
Rudenko I.V. 20
Rudic V.F. 44
Rudneva I.I. 302
Rusyn I.F. 170
Ruzhitsky A. O. 732
Ryabenko D. 584
Rybalchenko V.K. 540
Rybalko S.L. 576
Rybalko S.L. 608
Ryzhkina I.S. 716
Ryzhkina I.S. 718
Ryzhkina I.S. 706
Ryzhkina I.S. 712
Safaraliyeva Z.S. 114
Safiullin R.L. 228
Safronova G.V. 400
Sagach V.F. 670
Sagach V.F. 466
Sahautdinova R.A. 228
Salikhov Sh.I. 234
Salikhov Sh.I. 236
Samoilova Z.Y. 396
Samonina G.E. 614
Samonina G.E. 442
Samoylenko O.A. 494
Samoylova Z.Yu. 604
Sandomirsky B.P. 438
Sandomirsky B.P. 310
Sandric M.M. 316
Sapozhnikova T.A. 602
Sapozhnikova T.A. 458
Sapunova L. 412
Sapunova L.I. 398
Sapunova L.I. 408
Savchenkova L.V. 126
Savchuk O. M. 436
Schenyavsky I.Yo. 476
Schetinskay I.I. 562
Schetinsky M.I. 562
Schulze B. 112
Semashko T.V. 312
Semenov A.V. 178
Semenov V.E. 162
Semenova E.V. 178
Semernya L.G. 372
Serbin A.G. 272
Serbin A.G. 280
Serebrennikova G.A. 148
Serebryany A. M. 732
Sereda O.V. 292
Sergeenko N. 320
Sergeeva O.Y. 592
Serkov I.V. 594
Serkov I.V. 8
Sernov L.N. 166
Sevchenko O.G. 634
Seyed Mohammad Hosseini 342
Seyed Wajihallah Mousavi 342
Shabalina Yu.V. 206
Shablykin O.V. 208
Shablykin O.V. 78
Shablykina O.V. 72
Shadrin D.V. 410
Shafranovska A. 636
Shafranovskaya E.V. 630
Sharafutdinov R.M. 206
Sharipov I.M. 192
Sharkova N.A. 334
Sharkova N.O. 210
Shatalova O.V. 426
Shatirova M.I. 384
Shayda V.G. 302
Shchatko V.A. 414
Shchepina N.E. 220
Shelemeteva O.V. 168
Shelest D. 514
Shelyuk O.V. 632
Shepelenko I.V. 768
Sheremet A.A. 566
Sherman E.D. 712
Shestopalova A.V. 212
Shevchenko A. 514
Shevchenko V.B. 146
Shevtsovs E.F. 594
Sheykina N.V. 726
Sheykina N.V. 702
Shibryaeva L.S. 426
Shigarova A.M. 758
Shikhaliev Kh.S. 116
Shikhaliev Kh.S. 90
Shikhaliev X.S. 150
Shilin S.V. 134
Shilov V.V. 304
Shilova E.V. 166
Shishkina L.N. 634
Shishliannikova A. 270
Shishlyannikova T.A. 376
Shklyaev Yu.V. 54
Shkrabak O.A. 652
Shlakchotko E. 412
Shlyakhovenko V.O. 494
Shmanai V.V. 180
Shmanai V.V. 190
Shmanai V.V. 188
Shoba V.M. 696
Shpak E.G. 542
Shpylyova S.I. 624
Shtil N. A. 216
Shtil N.A. 202
Shtolko V.N. 448
Shurkhai S.F. 328
Shutava H. 218
Shutava H. 320
Shutava H. 270
Shutava H.G. 330
Shutava T. 218
Shved A.D. 576
Shvets S.A. 336
Shybyryn O.V. 128
Shylau V. 636
Shylau V.V. 534
Shymanskyy I.O. 428
Shyshkina O. 84
Shyshkina O.O. 214
Sidekhmenova A.V. 502
Sidorik L. 678
Sidorik L. 456
Sidorik L. 492
Sidorik L. 584
Sidorik L.L. 694
Sidyakin A.I. 380
Simac V. 316
Simac V. 766
Simac V. 260
Simenel A. 164
Simenel A.A. 68
Simenel A.A. 136
Simurov O.V. 430
Skachilova S.Ya. 166
Sklyar A.M. 76
Skochko A.B. 370
Skripets V.I. 6
Slepchenko G.B . 168
Slepchenko G.B. 56
Slivka M.V. 170
Slivka M.V. 98
Slivka Mar.V. 170
Smaliy R. V. 216
Smaliy R.V. 202
Smirnov O. 318
Smirnova G.V. 604
Smirnova G.V. 396

Smirnova I.M. 246
Smolii O.B. 172
Smolii O.B. 30
Snegur L.V. 174
Sobko V.M. 720
Sofilkanych A.P. 370
Sofroni L.V. 40
Sofroni L.V. 42
Sokolov V.B. 130
Sokolyk O.O. 488
Soldatkina M. 584
Soliliak Z. 510
Solokhin S.A. 276
Soloviev A.I. 508
Sorokina L.V. 606
Soroush Sardari 349
Soroush Sardari 350
Spiridovich A. 320
Spiridovich A.V. 330
Stan M.S. 641
Starodubtseva M.N. 516
Starosyla D.B. 608
Starosyla D.B. 576
Stepanenko S.P. 688
Stepanov U. 514
Stepanova E.V. 348
Stepanova E.V. 282
Stepanova L.I. 556
Stoian G. 641
Stoiko V.I. 346
Strashny V.V. 346
Strizhak O.V. 176
Strotska E.A. 596
Strutynskyi R.B. 610
Sturzoiu C. 641
Suchomlinov V.M. 462
Suchomlinova I.E. 462
Sukach V.A. 696
Sukharev Yu.S. 402
Sukhodub L.F. 76
Sukhovia M.I. 296
Supitchenko G. 270
Suprun S.M. 322
Suprun S.M. 346
Sybirna N. 510
Sydora N.V. 512
Sydorenko M.V. 578
Sydorenko O. V. 314
Syed Ibrahim Rizvi 640
Synytsya A.D. 196
Synyugin A.R. 204
Syrchin S.A. 346
Sytova M.V. 406
Tagayeva I.R. 480
Talabaev M.V. 156
Talipov S.A. 70
Tararov V.I. 100
Tarasova I.V. 178
Tarnavsky S.S. 204
Tashyrev O.B. 324
Tatulchenkov M.Yu. 180
Thomson A.E. 328
Timciuc K.S. 326
Timosheva A.P. 718
Tkachenko Y. 456
Tkachev V.I. 754
Tkachevskaya E.P. 372
Tkachuk T.M. 214
Tkachuk V.A. 20
Todor I.M. 624
Tolstov A.L. 184
Tomachinskaya L. 514
Topala L. 262
Topala L. 362
Torgalo L.O. 612
Trach Yu. 112
Treshchenkova Yu. A. 722
Treskunov K.A. 520
Tretiakova I. 456
Tribrat N.S. 628
Trokoz V. A. 404
Trokoz V.A. 366
Trushina V.A. 574
Tsapko M. 84
Tsapkov V.I. 44
Tsapkov V.I. 42
Tsapkov V.I. 40
Tsaryk N.V. 624
Tsavlovskii D.V. 200
Tseysler Yu.V. 710
Tshimanskaya T.V. 466
Tsikhanava N. 636
Tsvetkova E.A. 282
Tsvylev O.P. 406
Tsymbalyuk O.V. 622
Tsymbalyuk O.V. 724
Tsymbalyuk O.V. 686
Tsyryuk O.I. 434
Turluk D.V. 304
Tyasto Z.A. 12
Tymoschuk V.V. 182
Tymoschuk V.V. 160
Ukrainets I.V. 126
Ukrainets I.V. 460
Ulanovych L.I. 432
Ulaschick E.A. 188
Ulishchenko E.O. 446
Umarova B.A. 442
Usatii A. 362
Usatii A. 262
Vadzyuk O.B. 78
Vakhitova Yu.V. 192
Valiyeva A. R. 192
Van Staden R.I. 40
Varbanets L.D. 608
Varfolomeev V.N. 448
Vasilchenko A.V. 608
Vasilenko A.N. 26
Vasilenko A.P. 28
Vasilevskii D.A. 24
Vasiliev O.M. 146
Vasjuk V.A. 294
Vasylchenko O.V. 576
Vasylenko O.M. 32
Vasylenko O.M. 34
Vasylevska V.M. 450
Vazhnichaya Ye.M. 552
Veklich T.S. 652
Veliky M.M. 450
Veliky M.M. 428
Veliyev M.G. 384
Veliyeva D.S. 114
Venkat Rao 229
Verbova Y.M. 132
Verbynenko A.V. 494
Verves E.V. 30
Veselkina O.S. 452
Veselsky S.P. 464
Veselsky S.P. 292
Victorov I.V. 664
Vieru V.V. 42
Vikharev Yu.B. 94
Vikharev Yu.B. 92
Vikharev Yu.B. 96
Viktorov N.B. 452
Vincenzo Valenzi 727
Vinnikov A.I. 454
Vinogradova V.I. 138
Vishchuk O.S 250
Voitenko Z.V. 186
Voitenko Z.V. 80
Voitenko Z.V. 102
Voitsitsky V.M. 556
Voitsitsky V.M. 606
Volodin V.V. 254
Volodin V.V. 252
Volodin V.V. 410
Volodina S.O. 252
Volodina S.O. 254
Volodina S.O. 410
Voloshina A.D. 162
Volovenko Y.M. 214
Volovenko Yu.M. 540
Volovenko Yu.M. 194
Volovnenko T.A. 194
Volovnenko T.A. 540
Vorniku Z.N. 326
Vorobets Z.D. 546
Vorobeva G. 456
Voronin E.F. 28
Voronkova O.S. 454
Vovk A.I. 688
Vovk A.I. 26
Vovk M.V. 696
Voytenko L.V. 294
Vygera S.M. 756
Wolf J. 112
Yagolnik E.A. 426
Yagubova G.G. 384
Yakimovich I.V. 416
Yakimovich N.N. 416
Yakovenko L. 456
Yakovenko L. 678
Yakovishin L.A. 226
Yakovlev R.Ju. 544
Yakubtsova I.V. 638
Yakupova L.R. 228
Yanish Yu.V. 494
Yankovich S.I. 126
Yankovsky D.S. 612
Yaremchuk I.O. 172
Yarmoluk S.M. 204
Yarosh A.K. 482
Yaroshenko E.A. 754
Yaroshenko O. A. 684
Yarovoy I.R. 226
Yashchenko O.V. 358
Yazlovitskiy A.V. 138
Yegorova T.V. 186
Yegorova T.V. 102
Yemchenko N.L. 38
Yermakova T.S. 558
Yudina N.D. 56
Yunusov M.S. 618
Yunusov M.S. 602
Yurchenko O. O. 216
Yurchenko O.O. 202
Yurchenko S. O. 216
Yurchenko S.O. 202
Yurin V.M. 394
Yurin V.M. 382
Yurkshtovich N.K. 224
Yurkshtovich T.L. 222
Yurkshtovich T.L. 224
Yurkshtovich T.L. 22
Yusubalieva G.M. 664
Zabelo O.I. 304
Zabotin A.I. 680
Zagoskina N.V. 744
Zaitsev M 492
Zakashun T.Ye. 10
Zaletok S.P. 494
Zarudi F.S. 458
Zavelevich M.P. 582
Zavelevich M.P. 608
Zavelevych M.P. 576
Zavgorodniy M.P. 58
Zavgorodny M.P. 446
Zayceva N.V. 256
Zelenyi S. 584
Zenkova M.A. 354
Zhabinskii V.N. 64
Zhabinskii V.N. 198
Zhabinskii V.N. 200
Zhabinskii V.N. 620
Zharikov A.Yu. 490
Zharkova L.D. 608
Zhavnerko G.K. 180
Zhebrakova I.V. 570
Zheldakova R.A. 388
Zheldakova R.A. 144
Zheleznyak T.G. 326
Zheltonozhskaya T. 142
Zheltuhin N.K. 166
Zheltukhina G.A. 66
Zherebker K.Ya. 68
Zhigacheva I.V. 704
Zhmakova N.A. 328
Zhovnir V. 456
Zhuk I.V. 740
Zhuk O.I. 738
Zhuk V.V. 742
Zhukotsky E.K. 210
Zhukotsky E.K. 334
Zhukova I.A. 570
Zhukova Ya.F. 240
Zhukovskaya N.A. 154
Zhuravel E. 584
Zima I.G. 496
Zimichev. A.V. 62
Zlygosteva M.V. 96
Zobov V.V. 498
Zobov V.V. 162
Zolotar R.M. 152
Zubenko Y.S. 152
Zubenko Y.S. 188
Zubenko Yu.S. 156
Zubenko Yu.S. 388
Zverev Ya.F. 490
Zverev Ya.F. 424
Zvereva T.D. 152
Zvereva T.D. 154

Научное издание

Тезисы докладов
Научно-практической конференции
«БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА:
фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения»
Новый Свет, Крым, Украина
23–28 мая 2011

Редактор: *В.С. Мартынюк*

Дизайн: *В.С. Мартынюк*
Дизайн обложки: *В.С. Мартынюк*
Верстка: *В.С. Мартынюк*

Подписано в печать 27.04.2011 г.
69 усл. печ. л. Формат: 86 x122M/16
Бумага офсетная
Гарнитура Arial,
Печать: офсетная
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, корп. 1.
www.publisher.science-center.net
e-mail: mavis@science-center.net
тел.: 8 050 6535592

Отпечатано в типографии ФЛП Бровко А.А.
96500, г. Саки, ул. Тимирязева, 30.

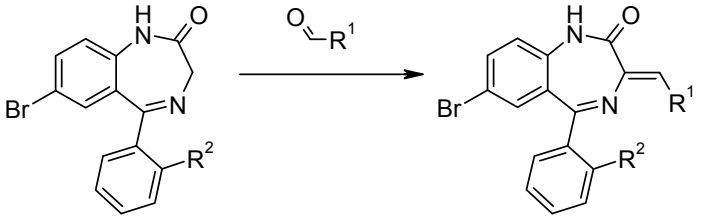
ДОПОЛНЕНИЯ

СИНТЕЗ, АФФИНИТЕТ И ТИП ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ 7-БРОМ-5-АРИЛ-3-ГЕТАРИЛИДЕН-1,2-ДИГИДРО-3Н-1,4-БЕНЗДИАЗЕПИН-2-ОНОВ

Павловский В.И., Бачинский С.Ю., Буренкова Н.А, Бойко И.А., Андронати С.А.

Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, Одесса, Украина
e-mail: medchem_department@ukr.net

С целью поиска новых селективных лигандов бенздиазепиновых рецепторов центрального (ЦБДР) и периферического (ПБДР) типа нами синтезирован ряд 7-бром-5-арил-3-гетарилиден-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов **1-6**. В условиях реакции Кневенагеля в результате взаимодействия 7-бром-5-арил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов с замещенными ароматическими альдегидами получены целевые соединения. Структура полученных соединений подтверждена методами масс спектрометрии, ИК- и ЯМР ^{1}Н спектроскопии и методом РСА для соединения **1**.



№	R^1	R^2	Аффинитет, %I (IC_{50}, нМ)		GS (тип функциональной активности)
			ЦБДР	ПБДР	
1	2-C_5H_4N	Cl	94.1 (95.1±5)	53.3	1.1 (антагонист)
2	3-C_5H_4N	Cl	99.0 (10.0±1)	30.9	1.1 (антагонист)
3	4-C_5H_4N	Cl	96.4 (45.7нМ) [1]	43.3 [1]	-
4	2-C_4H_3O	H	82 (625.0±10)	21.2	1.5 (частичный агонист)
5	3-CH_3-2-C_4H_2O	H	46.2	0.7	-
6	2-C_4H_3S	H	24.1	0.6	-

Методом радиолигандного анализа *in vitro* изучена способность исследованных соединений в концентрации $1\cdot10^{-6}$М конкурентно ингибировать специфическое связывание (I, %) радиолигандов [^{3}Н]флумазенил и [^{3}Н]РК11195 с ЦБДР и ПБДР синаптосомальной и митохондриальной фракций мембран коры головного мозга крыс, соответственно.

Для аффинных к ЦБДР соединений определены значения величин IC_{50}, ГАМК-сдвига (GS) и тип функциональной активности.

В ряду 3-пиридинзамещенных наиболее аффинным и селективным к ЦБДР является соединение **2**, с величиной GS=1.1.

Данная группа соединений характеризуется низким аффинитетом к ПБДР.

Выявленные закономерности влияния природы и положения гетероатома в 3-гетарилиденовом фрагменте на аффинитет к БДР позволят целенаправленно вести поиск новых селективных лигандов БДР.

Литература:

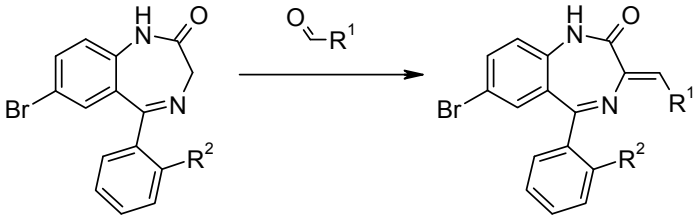
1. *В.И. Павловский, С.Ю. Бачинский, Н.А. Ткачук, С.Ю. Макан, С.А. Андронати, Ю.А. Симонов, И.Г. Филиппова, М. Гданец.* // Синтез, структура и аффинитет к бенздиазепиновым рецепторам ЦНС 3-арилиден(гетарилиден)-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов – Химия гетероциклических соединений, 2007, №8, с. 1213-1225.

SYNTHESIS, AFFINITY FOR CENTRAL AND PERIPHERAL BENZODIAZEPINE CNS RECEPTORS AND TYPE OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEW 7-BROMO-5-ARYL-3-HETARYLIDENE-1,2-DIHYDRO-3H-1,4-BENZODIAZEPINE-2-ONES

Pavlovsky V.I, Bachinsky S.Yu., Burenkova N.A, Boiko I.A. Andronati S.A.

A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of the NAS of Ukraine, Odessa, Ukraine
e-mail: medchem_department@ukr.net

In order to search for new selective benzodiazepine CNS receptor ligands of central (CBR) and peripheral (PBR) type we have synthesized a number of 7-bromo-5-aryl-3-hetaryliden(e)-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones **1-6** the target compounds were obtained. Under conditions of Knoevenagel Reaction as a result of the interaction between 7-bromo-5-aryl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones with substituted aromatic aldehydes. The structures of the compounds were confirmed by mass spectrometry, IR and ^{1}H NMR spectroscopy, and through the XRay method for compound 1.



№	R^1	R^2	Affinity, %I (IC_{50}, nM)		GS (type of functional activity)
			CBR	PBR	
1	2-C_5H_4N	Cl	94.1 (95.1±5)	53.3	1.1 (antagonist)
2	3-C_5H_4N	Cl	99.0 (10.0±1)	30.9	1.1 (antagonist)
3	4-C_5H_4N	Cl	96.4 (45.7нM) [1]	43.3 [1]	-
4	2-C_4H_3O	H	82 (625.0±10)	21.2	1.5 (partial agonist)
5	3-CH_3-2-C_4H_2O	H	46.2	0.7	-
6	2-C_4H_3S	H	24.1	0.6	-

The ability of the studied compounds at a concentration of $1 \cdot 10^{-6}$M to competitively inhibit the specific binding (I,%) of radioligands [^{3}H]flumazenil and [^{3}H]PK11195 with CBR and PBR synaptosomal and mitochondrial fractions of the membranes of the rats cerebral cortex, respectively, be the radioligand analysis method was studied *in vitro.*

Values of IC_{50}, GABA shift (GS) and type of functional activity for CBR affinitive compounds were identified. The compound **2** with the value of GS = 1.1 is the most affinitive and selective for CBR in the series of 3-pyridine substituted. This group of compounds is characterized by a low affinity for PBR. The revealed regularities of influence of nature and heteroatom position in the 3-hetarylidene fragment on the affinity for BDR allow realization of targeted search for new selective ligands BDR.

Literature:

1. *V.I. Pavlovsky, S.Yu. Bachinsky, N.A.Tkachuk, S.Yu. Makan, S.A. Andronati, Yu.A. Simonov, I.G. Filippova, M. Gdaniec. / /* Synthesis, structure and affinity for CNS benzodiazepin receptors 3-arylidene (hetaryliden) -1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-2-ones - Chemistry of Heterocyclic Compounds, 2007, № 8, pp. 1213-1225.

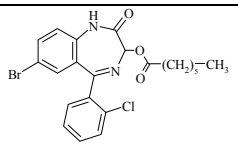
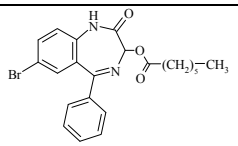
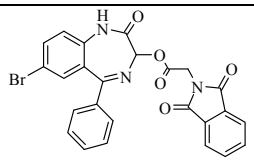
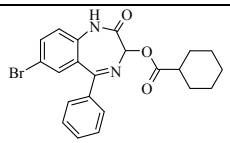
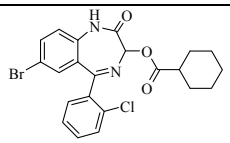
NEW 3-HYDROXYDIAZEPINE DERIVATIVES ANTICONVULSIVE EFFECTS AND AFFINITY FOR CENTRAL BENZODIAZEPINE CNS RECEPTOR

[1]Kaschenko O.A.,[1]Shandra A.A., [2]Pavlovsky V.I., [2]Semenishina E.A., [2]Yurpalova T.A., [2]Andronati S.A.

[1]Odessa State medical University
[2] A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of the NAS of Ukraine, Odessa, Ukraine
e-mail: medchem_department@ukr.net

The aim of the work was to investigate the new 3-hydroxydiazepine **1-5** derivatives anticonvulsive activity.

3-Aciloxy-1,2-dihydro-3H-1,4-benzdiazepine-2-onov **1, 2** synthesis was described earlier [1], **3-5** compounds were obtained using analogous method.

№		ED_{50} on the 6-Hz model, mg/kg	ED_{50} on the MES model, mg/kg	IC_{50}, nM, (I,%)
1		0.91±0.15	0.57±0.14	90
2		0.99±0.14	0.62±0.13	(53%)
3		1.10±0.17	0.71±0.15	(53%)
4		1.21±0.16	0.80±0.16	(74%)
5		0.75±0.14	0.45±0.14	75

The experiments were performed on male CBA mice weighting 20-25 g using both maximal electroshock (MES) and 6-Hz-induced seizure syndrome models. The last one was induced by intracorneal electrical stimulation [6 Hz, 32mA, 0,2 ms duration, during 3 s]; MES – by 50 Hz impulses, 50 mA and 0,2 s duration. The number of mice with/without convulsions were registered. Seizures intensity and duration were evaluated as well. The compounds investigated were dissolved in Twin-80 and injected i.p. in 0,2 ml volume on 20 g body weight 40 min prior to testing. Control mice received analogous volumes of physiological solution.

Experimental results showed that al tested compounds revealed anticonvulsive effects in conditions of the used seizure models. Compounds **1** and **5** expressed the most anticonvulsive activity in these experimental models. Compound **5** (1,2 mg/kg) and **1** (1,5 mg/kg) protected 83% and 67% of animals from 6-Hz-induced seizures. Their $ЕД_{50}$ values were equal to 0,75±0,14 mg/kg (**5**) and 0,91±0,15 mg/kg (**1**).

All the tested compounds (0.9; 1.2; 1.5 mg/kg) in the MES model decreased number of mice with hindlimbs tonic extension. In this model Ed_{50} values were equal to 0,45±0,14 mg/kg (**5**) and 0,57±0,14 mg/kg (1).

Therefore, our experiments revealed new 3-hydroxydiazepine derivatives anticonvulsive activity which characterizes by 6-Hz- and MES-induced seizures dose-dependent decrease in mice. One should mentioned that greater doses of all compounds were effective in 6-Hz model of seizures. Resuming, its reasonable to investigate new 3-hydroxydiazepine derivatives anticonvulsive activity mechanisms of action.

The ability of the studied compounds at a concentration of $1 \cdot 10^{-6}$M to competitively inhibit the specific binding IC_{50}(I,%), of radioligand [^{3}H]flumazenil with CBR synaptosomal fractions of the membranes of the rats cerebral cortex, respectively, be the radioligand analysis method was studied *in vitro.*

References:

1.*S.A. Andronati et al.* ONU Visnyk. – 2008. – Vol.13, N11. – P. 37-45 (in Ukrainian).