

УДК 665.58.002.39(088.8)

І. І. Романовська, Ю. А. Шестеренко, О. В. Севастьянов  
ІММОБІЛІЗАЦІЯ ТИРОЗИНАЗИ В МОДИФІКОВАНИЙ ПОЛІ-N-ВІНІЛПІРОЛІДОН

На основі виділеної тирозинази грибів *Agaricus bisporus*, іммобілізованої в полі-N-вінілпіролідон, модифікований золам полікремнієвої кислоти, був отриманий біокатализатор, придатний для гетерогенного каталізу, з підвищеною стабільністю в умовах високих температур. У розроблених умовах (рН 6,5, температура 25 °С, час трансформації — 1 год, фенолоксидазна активність — 50–1000 ОД/см<sup>3</sup>) препарат каталізував повне окиснення субстрату в реакторі періодичної дії протягом 8 циклів, зі збереженням високого ступеня його трансформації в наступні 7 циклів.

**Ключові слова:** тирозиназа грибів, полі-N-вінілпіролідон, іммобілізація, біокатализатор.

UDC 665.58.002.39(088.8)

I. I. Romanovska, Yu. A. Shesterenko, O. V. Sevastyanov  
TYROSINASE IMMOBILIZATION IN MODIFIED POLY-N-VINYLPYRROLIDONE

Based on isolated *Agaricus bisporus* fungi tyrosinase, immobilized in poly-N-vinylpyrrolidone, modified by polysilicic acid sol, the biocatalyst was obtained, being suitable for heterogeneous catalysis, with increased stability at elevated temperature conditions. Under conditions developed (pH 6.5, temperature 25 °C, time of transformation — 1 h, phenoloxidase activity 50–1000 U/cm<sup>3</sup>) the preparation had catalyzed total substrate oxidation in batch reactor during 8 cycles with high level of its transformation retaining during the next 7 cycles.

**Key words:** fungi tyrosinase, poly-N-vinylpyrrolidone, immobilization, biocatalyst.

УДК 616.341-008.6-085.322+612.33.014-015.32.085.1

О. В. Сторчило, канд. біол. наук, доц.

## ОЦІНКА ВПЛИВУ СУМАРНОГО ЕКСТРАКТУ ПЛОДІВ РОЗТОРОПШІ ПЛЯМИСТОЇ НА АКТИВНІСТЬ ГЛЮКОЗНОЇ ТРАНСПОРТНОЇ СИСТЕМИ У ХРОНІЧНОМУ ЕКСПЕРИМЕНТІ *IN VIVO* НА ФУНКЦІОНУЮЧІЙ ДІЛЯНЦІ ТОНКОЇ КИШКИ ЩУРІВ

Одеський національний медичний університет

### Вступ

Внаслідок забруднення довкілля виникають зміни в обміні речовин в організмі людини, в її адаптаційних і регуляторних механізмах [1]. Для корекції цих порушень часто використовують фітопрепарати, серед яких усе більшу увагу приділяють розторопші плямистій [2–4]. Через високий вміст у плодах силімарину розторопша є основою для створення цілої низки гепатопротекторів, але її ефекти не обмежуються тільки мембранопротекторними властивостями цього компонента [2–4]. Тому виникла думка дослідити вплив сумарного екстракту розторопші, що містить як водо-, так і жиророзчинні активні компоненти, на функціональну активність тонкої кишки. Реперною для її оцінки є система транспорту глюкози, в оцінюванні активності якої вирішальну роль відіграє рівень методичного підходу: так, редуковані

системи дозволяють досліджувати механізми функціонування систем, які мало залежать від вищих рівнів регуляції організму, отже, вони надають уявлення про роботу базових, фундаментальних механізмів [5]. Але реальні умови існування організму передбачають тонку регуляцію його функцій. У цьому процесі беруть участь вищі рівні регуляції — нейрогуморальна й ендокринна системи. Оцінити їх внесок у регуляцію функціональної активності тонкої кишки можливо тільки за умов цілісного організму *in vivo*. Нами було розроблено оригінальну методику формування ділянок тонкої кишки, що безпосередньо включена до системи травлення і зберігає іннервацію, кровопостачання та пасаж хімуса і дозволяє досліджувати функціональну активність тонкої кишки у хронічному експерименті на ненаркотизованих тваринах за умов відсутності операційної травми і стресу [6–7].

Раніше нами було показано вплив сумарного екстракту розторопші та його окремих фракцій (водо- та жиророзчинної) на транспорт глюкози в тонкій кишці щурів за умов *in vitro* [8]. З'ясувалося, що для кожної фракції є характерними власні ефекти на глюкозну транспортну систему. Але найкращий нормалізуючий і стабілізуючий вплив на її роботу справляв саме сумарний екстракт, який містить як водо-, так і жиророзчинні компоненти [8]. Тому метою роботи стало визначення впливу сумарного екстракту розторопші на активність системи транспорту глюкози в функціонуючій ділянці тонкої кишки щурів у хронічному експерименті *in vivo*.

### Матеріали та методи дослідження

Експерименти проведено на щурах-самцях породи Вістар масою 170–180 г, що утримувалися на стандартному раціоні

віварію і були позбавлені їжі протягом 18–24 год перед експериментом. Внаслідок оперативного втручання з тонкої кишки утворювали 2 У-подібних співустя шляхом формування 2 анастомозів за принципом «кінець у бік» і виводили вільні кінці кишки («живі» фістули) у бік тварини, де фіксували їх за допомогою стандартних металевих фістул (рис. 1). З урахуванням «живих» фістул довжина досліджуваної ділянки становила 10 см. На 4–5-ту добу після операції тварину перфузували за допомогою перфузійного насоса “Zalimp” (Польща) (швидкість перфузії — 0,4–0,6 мл/хв). Як контрольний перфузійний розчин використовували 25 ммоль/л розчин глюкози на розчині Рінгера і 25 ммоль/л розчин глюкози на розчині Рінгера, який містив сумарний екстракт плодів розторопші. Сумарний екстракт розторопші є висушений при кімнатній температурі водно-спиртовий екстракт мелених плодів розторопші виробництва НВ ТОВ «Житомир-біопродукт» (3 г плодів + 10 мл дистильованої води + 20 мл етилового спирту), потім розведений у розчині Рінгера (10 мл екстракту висушували і заливали 100 мл розчину Рінгера). До отриманого розчину додавали глюкозу. Для контролю можливого розбавлення перфузійного розчину рідинами травного тракту (слина, шлунковий, кишковий і панкреатичний соки, жовч) до нього додавали невсмоктувальний маркер — ПЕГ-400. Концентрацію глюкози визначали за методом [9] колориметрично на КФК-2МП,  $\lambda=625$  нм. Концентрацію ПЕГ визначали за модифікованим методом [10] колориметрично на КФК-2МП,  $\lambda=465$  нм. Статистичну обробку отриманих даних проводили за програмою “Primer Biostatistics”.

#### Результати дослідження та їх обговорення

На рис. 2 наведено динаміку всмоктування глюкози за відсутності та у присутності сумарного екстракту розторопші.

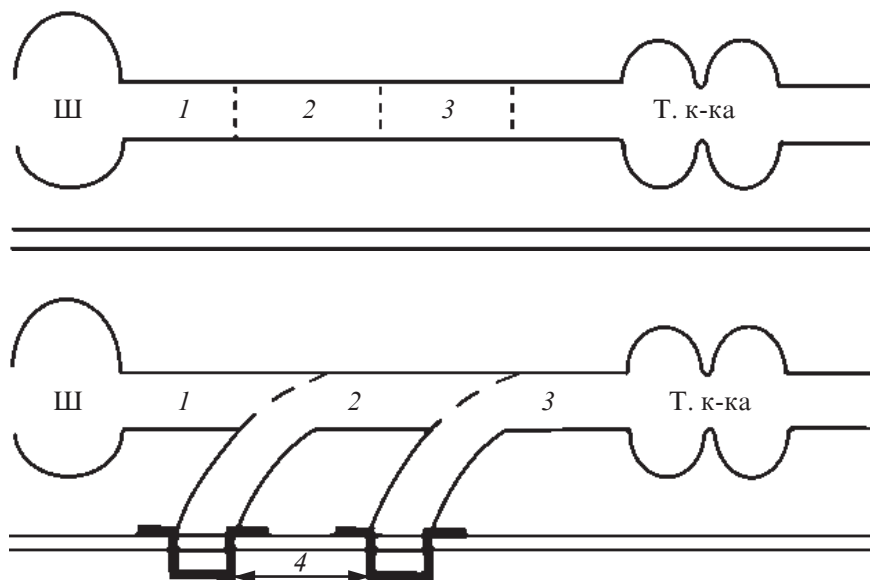


Рис. 1. Схема формування функціонує ділянки тонкої кишки щурів: Ш — шлунок; Т. к-ка — товста кишка; 1–3 — ділянки тонкої кишки; 2 — функціонує ділянка тонкої кишки; 4 — металеві фістульні трубки

Показано, що присутність у перфузійному розчині сумарного екстракту розторопші на 40 % гальмує швидкість всмоктування глюкози в тонкій кишці: у

середньому за годину перфузії ( $7,62 \pm 0,26$ ) проти ( $12,72 \pm 0,13$ ) мкмоль/л у контролі (за відсутності розторопші) ( $p < 0,001$ ). Це не може бути пояс-

Швидкість всмоктування, мкмоль/л

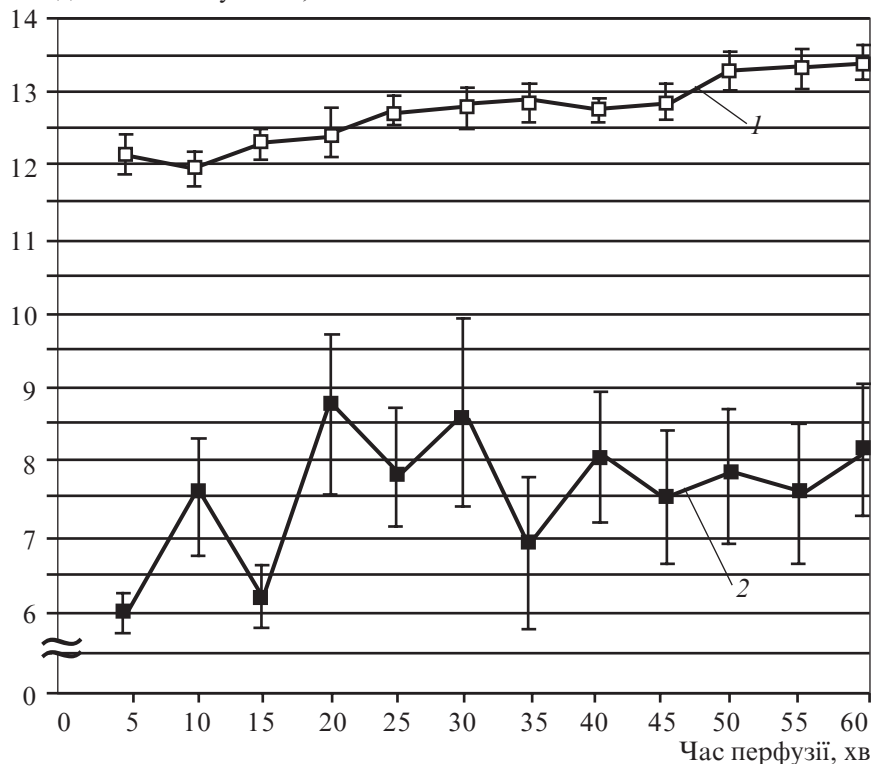


Рис. 2. Швидкість всмоктування глюкози з її 25 ммоль/л розчину за відсутності (1) та в присутності сумарного екстракту розторопші в функціонує ділянці тонкої кишки щурів у хронічному експерименті in vivo за відсутності наркозу, операційної травми і стресу

нено розбавленням перфузійного розчину травними соками, оскільки концентрація ПЕГ у відтікаючому перфузаті не тільки не є меншою, ніж у вихідному перфузійному розчині, а, навпаки, підвищується через концентрування розчину. Цей результат добре узгоджується з даними, що були отримані нами раніше [11]. Не такий суттєвий, як *in vivo*, гальмівний вплив розторопші на транспорт глюкози було зафіксовано також в експериментах *in vitro* на інтактних тваринах [8]. Вочевидь, гальмівний ефект розторопші на транспорт глюкози сприяє обмеженню пулу глюкози в крові і, таким чином, зменшує навантаження на підшлункову залозу. Це знаходить підтвердження в численних дослідженнях на різних методичних рівнях [3; 12]. На основі результатів цих досліджень плоди розторопші широко використовують як гіпоглікемічний засіб у профілактиці та навіть терапії цукрового діабету [3; 12; 13]. Привертає увагу той факт, що з цією метою використовують не патентовані фармпрепарати на основі розторопші, а саме цільні плоди, тобто суму всіх діючих складових. Відомо, що ціле не є проста сума його складових, тому ймовірно, що подібний ефект спричинено кількома (або усіма) компонентами сумарного екстракту, які, можливо, утворюють біологічно активні комплекси з більш природними зв'язками, ніж у препаратах, які містять 1 або 2 компоненти плодів розторопші.

Отже, сумарний екстракт плодів розторопші, що містить як водо-, так і жиророзчинні компоненти, за умов хронічного експерименту *in vivo* сприяє вірогідному гальмуванню транспорту глюкози в кров. Це обмежує надходження її до крові і, таким чином, може сприяти полегшенню глікемічного стану у

хворих на цукровий діабет, ожиріння, атеросклероз та інші хвороби метаболізму.

### Висновки

У хронічному експерименті за умов відсутності стресу й операційної травми показано вірогідне (40 %) гальмування транспорту глюкози в функціонуючій ділянці тонкої кишки ненаркотизованих щурів у присутності сумарного екстракту плодів розторопші. Це не може бути пояснено розбавленням перфузійного розчину травними соками розташованих вище відділів шлунково-кишкового тракту, оскільки супроводжується, навпаки, всмоктуванням із нього води. Отримані дані можуть бути використані при розробці заходів лікування хворих на метаболічні хвороби для поліпшення їх глікемічного стану.

### ЛІТЕРАТУРА

1. *Исследование БАД с антиоксидантной активностью* / Т. В. Вахтерова, С. Г. Сбоева, О. Н. Давыдова, И. Н. Бардин-Денисов // Фармация. — 2005. — № 2. — С. 46–48.
2. *L. Silybum marianum in vitro-flavonolignan production* / L. Tůmová, J. Řimáková, J. Tůma, J. Dušek // PLANT SOIL ENVIRON. — 2006. — Vol. 52, N 10. — P. 454–458.
3. *Tamayo C. Review of clinical trials evaluating safety and efficacy of milk thistle (Silybum marianum [L.] Gaertn.)* / C. Tamayo, S. Diamond // Integr Cancer Ther. — 2007. — Vol. 6, N 2. — P. 146–157.
4. *Silymarin, the antioxidant component of Silybum marianum, prevents sepsis-induced acute lung and brain injury* / H. Z. Toklu, A. T. Tunalı, A. Velioglu-Ogunc [et al.] // J. Surg Res. — 2008. — Vol. 145, N 2. — P. 214–222.
5. *Сторчило О. В. Гидролиз и всасывание углеводов в изолированном и функционирующем участках тонкой кишки крыс в хронических опытах* / О. В. Сторчило, Э. Г. Гурман, А. М. Уголев // Докл. АН СССР. — 1989. — Т. 305, № 3. — С. 758–763.
6. *Сторчило О. В. Спосіб визначення засвоєння живильної суміші в хронічному експерименті in vivo*

/ О. В. Сторчило // Патент України на винахід № 77500. — (51) МПК (2006). — G09B 23/28 (2006/01). — G01N 33/50.

7. *Декларац. патент на корисну модель*. — (11) 6516. — (51) 7 A61B17/00. Спосіб формування ділянки кишки для дослідження її функцій в хронічному експерименті *in vivo* за О. В. Сторчило / О. В. Сторчило. — (46) 16.05.2005. Бюл. № 5.

8. *Сторчило О. В. Модифікація жовчю впливу рослинних екстрактів на транспорт вуглеводів у нащадків опромінених тварин* / О. В. Сторчило, О. А. Багірова // Одеський медичний журнал. — 2008. — Т. 106, № 2. — С. 13–18.

9. *Scott T. A. The determination of hexoses with antrone* / T. A. Scott, E. H. Melvin // Analyt. Chem. — 1953. — N 25. — P. 1656–1658.

10. *Malawer S. J. An improved turbidimetric analysis of polyethylene glycol utilizing an emulsifier* / S. J. Malawer, D. W. Powell // Gastroenterology. — 1967. — Vol. 53, N 2. — P. 250–256.

11. *Сторчило О. В. Характеристика изолированного и неизолированного участка тонкой кишки в хронических экспериментах* / Э. Г. Гурман, О. В. Сторчило // Физиол. журн. им. И. И. Сеченова (Sechenov Physiological Journal). — 1996. — Т. 28, № 2. — С. 103–109.

12. *Hussain S. A. Silymarin as an adjunct to glibenclamide therapy improves long-term and postprandial glycemic control and body mass index in type 2 diabetes* / S. A. Hussain // J. Med. Food. — 2007. — Vol. 10, N 3. — P. 543–547.

13. *The efficacy of Silybum marianum (L.) Gaertn. (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial* / H. F. Huseini, B. Larijani, R. Heshmat [et al.] // Phytotherapy Results. — 2006. — Vol. 20, N 12. — P. 1036–1039.

ОЦІНКА ВПЛИВУ СУМАРНОГО ЕКСТРАКТУ ПЛОДІВ РОЗТОРОПШІ ПЛЯМИСТОЇ НА АКТИВНІСТЬ ГЛЮКОЗНОЇ ТРАНСПОРТНОЇ СИСТЕМИ У ХРОНІЧНОМУ ЕКСПЕРИМЕНТІ *IN VIVO* НА ФУНКЦІОНУЮЧІЙ ДІЛЯНЦІ ТОНКОЇ КИШКИ ЩУРІВ

Метою роботи стало вивчення впливу сумарного екстракту плодів розторопші, що містить як водо-, так і жиророзчинні компоненти, на транспорт глюкози у функціонуючій ділянці кишки, яка зберігає іннервацію, водопостачання і пасаж хімуса, у хронічному експерименті *in vivo* за відсутності операційної травми, наркозу і стресу.

Показано вірогідне гальмування транспорту глюкози у функціонуючій ділянці кишки на 40 % у присутності сумарного екстракту розторопші. Отримані дані можуть бути використані при розробці методів лікування пацієнтів з метаболічними хворобами для поліпшення їх глікемічного стану.

**Ключові слова:** розторопша, транспорт глюкози, функціонуюча ділянка тонкої кишки.

ESTIMATION OF THE EFFECT OF MILK THISTLE FRUITS SUMMARY EXTRACT ON THE ACTIVITY OF GLUCOSE TRANSPORT SYSTEME IN THE CHRONIC EXPERIMENT *IN VIVO* ON THE FUNCTIONING FRAGMENT OF THE RATS' SMALL INTESTINE

The goal was to investigate the effects of the milk thistle fruits summary extract on the glucose transport in the functioning fragment of the small intestine, which has normal innervation, blood circulation and passage of chyme in the chronic experiment *in vivo* under the absence of the narcosis, trauma and stress.

The reliable inhibition of glucose transport in the functioning part of the small intestine by 40% in the presence of the milk thistle fruits summary extract is shown. These data can be used for the development of methods of treatment for the patients with metabolic diseases for the improvement of their glycemic state.

**Key words:** milk thistle fruits, glucose transport, functioning fragment of small intestine.

#### УДК 616.13-018.74

О. О. Тарабрін, *д-р мед. наук, проф.*,  
О. В. Петелкакі,  
С. С. Щербаков,  
Д. Г. Гавріченко

## ВПЛИВ ПОЄДНАНОГО ЗАСТОСУВАННЯ L-АРГІНІНУ ТА ПЕНТОКСИФІЛІНУ НА ПРОЯВИ МОДЕЛЬОВАНОГО СУБАРАХНОЇДАЛЬНОГО КРОВОВИЛИВУ У ЩУРІВ

*Одеський національний медичний університет*

Субарахноідальний крововилив (САК) — тяжке захворювання, яке супроводжується різними неврологічними розладами та значною летальністю. Так, летальний кінець спостерігається у близько 50 % хворих, а у 30 % хворих, що одужали, наявні тяжкі дефекти нервової системи. Багато експериментальних і клінічних свідчень указують на значення окиснювального стресу в механізмах формування гострого ушкодження тканини головного мозку, а також у виникненні та розвитку церебрального вазоспазму як патогенетичних елементів формування наслідків САК [1; 2; 6]. Джерелами утворення вільних радикалів є надмірне їх надходження в результаті порушення мітохондріального дихального ланцюжка, а також

позаклітинний гемоглобін [6]. Експериментальні дослідження свідчать про зв'язок продукції вільних радикалів та апоптозу нейронів, а також ендотеліальних клітин, підвищення проникності гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) і змін реактивності судин по відношенню до судинозвужувальних факторів за умов моделювання САК. Доцільним є вивчення одночасного коригуючого впливу на функцію ендотеліоцитів і продукцію прозапальних цитокінів, що до останнього часу не проводилося.

**Мета** цього дослідження — вивчення особливостей перебігу експериментальної моделі САК у щурів за умов застосування L-аргініну, який стимулює продукцію оксиду азоту, та пентоксифіліну (ПТФ), що знижує продукцію прозапаль-

них цитокінів і має антиоксидантні властивості [8].

#### Матеріали та методи дослідження

Експерименти проведені за умов гострого дослідження на щурах-самцях лінії Вістар масою 180–250 г. Під кетаміновим наркозом (100,0 мг/кг, в/чер) відтворювали модель САК — стереотаксично вводили автокров у тім'яно-скроневу зону обох півкуль (150 мкл) за координатами (AP = 2,7; L = 3,5; H = 5,7) [7], а після завершення мікроін'єкцій і герметизації отворів у черепі у велику цистерну мозку вводили 0,3 мл автокрові [10].

На шосту годину від моменту введення автокрові щурів спостерігали на відкритій площадці, визначаючи кількість тварин, які зберігали верти-