

ГЕСПЕРИДИН, ЯК АКТИВНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ІНГРЕДІЄНТ ДЛЯ ЗАПОБІГАННЯ ОТРУЄНЬ ФОСФОРОРГАНІЧНИМИ РЕЧОВИНАМИ

**Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І., Кулик В.Б., Чумак В.В., Лісовий В.М.,
Слишинська Е.В.**

Київський національний університет технологій та дизайну, кафедра промислової фармації, м Київ, Україна, e-mail: v.bessarabov@kyivpharma.eu

В даній статті розглянута проблема отруєнь фосфорорганічними речовинами та проведення премедикації за допомогою біологічно-активної речовини флавоноїдної природи – гесперидина. В якості модельної речовини фосфорорганічної природи використовували параоксон. Дослідження проводили спектрофотометричним методом при довжині хвилі 405 нм. Визначали активність бутирилхолінестерази (ХЕ) сироватки крові людини *ex vivo*. В результаті дослідження були побудовані діаграми зміни активності холінестерази в присутності параоксона (0,01 мкМ; 0,005 мкМ; 0,0025 мкМ) та з попереднім додаванням гесперидина (200 мкМ; 100 мкМ; 50 мкМ). Показано, що при додаванні параоксона в сироватку крові активність ХЕ різко знижується. Встановлено, що при попередньому додаванні в систему гесперидина, ступінь інгібування ХЕ параоксоном зменшується майже на 45%.

Ключові слова: фосфорорганічні речовини, параоксон, гесперидин, активність холінестерази.

HESPERIDINE AS AN ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT FOR THE PREVENTION POISONING OF PHOSPHORORGANIC SUBSTANCES

**Bessarabov V.I., Kuzmina G.I., Kulyk V.B., Chumak V.V., Lisovyi V.M.,
Slyshynska E.V.**

Kyiv National University of Technologies and Design, Department of Industrial Pharmacy, Kyiv, Ukraine, e-mail: v.bessarabov@kyivpharma.eu

This article addresses the problem of poisoning with organophosphorus substances and carrying out premedication with the help of a biologically active substance of the flavonoid nature – hesperidin. As a model substance of organophosphorus nature used paraoxone. The studies were performed by spectrophotometric method at a wavelength of 405 nm. The activity

of butyrylcholinesterase (HE) of human serum was determined ex vivo. As a result of the study, diagrams of changes in cholinesterase activity in the presence of paraoxone (0.01 μM ; 0.005 μM ; 0,0025 μM) and with the preliminary addition of hesperidin (200 μM ; 100 μM ; 50 μM) were constructed. It was shown that the activity of HE was dramatically reduced when paraxone was added to the serum. It was found that upon preliminary addition to the system of hesperidin, the degree of inhibition of HE by paraoxone decreased by almost 45%.

Keywords: organophosphorus substances, paraoxon, hesperidin, cholinesterase activity.

Фосфорорганічні речовини (ФОС) займають важливе місце не тільки в сільськогосподарській галузі, а й в хімічній та фармацевтичній промисловості. Використання ФОС забезпечують збільшення виробництва продуктів харчування та є профілактичними засобами у боротьбі з комахами та інвазійними шкідниками [1]. У промисловості фосфорорганічні сполуки використовують як активні багатофункціональні присадки до мастил, при флотації руд, у виробництві розчинників, пластифікаторів, негорючих пластмас. Вони поєднують у собі властивості мийних, протикорозійних і протизносних присадок та є антиокиснювачами і депресорами [2]. Не дивлячись на високу токсичність фосфорорганічних сполук, їх застосовують у медичній практиці. Застосування здійснюється місцево, загалом при лікуванні глаукоми. До такого препарату відноситься армін [3].

Серед фосфорорганічних сполук є речовини з різною токсичністю для людини – від мало- до високотоксичних. Окремі високотоксичні сполуки є бойовими отруйними речовинами нервово-паралітичної дії. Гранично допустима концентрація для різних фосфорорганічних сполук варіює від 0,02 до 0,5 $\text{мг}/\text{м}^3$ [4]. Серед високотоксичних та середньої токсичності пестицидів в Україні широко застосовуються метилпаратіон, метилмеркаптофос, дихлофос, бензофосфат, хлорофос, метилнітрофос, карбофос. Вони токсичніші за хлорорганічні інсектициди, але менш стійкі в навколишньому середовищі й тому менш небезпечні з погляду екології. Згідно з Всесвітньою Організацією Охорони Здоров'я (ВООЗ) щороку у всьому світі відбувається близько 3 мільйонів отруєнь

пестицидами. Використання фосфорорганічних речовин погано відрегульовано та їх легка доступність є наслідком великої кількості самоотруень [5]. Основний патогенетичний механізм дії фосфорорганічних сполук ґрунтується на пригніченні активності холінестераз – ферментів, що гідролізують ацетилхолін і бутирилхолін та відіграють важливу роль у процесі синаптичної передачі нервового імпульсу в холінергічних утвореннях [6].

Мета дослідження: визначення активності бутирилхолінестерази (ХЕ) в присутності параоксона та з попереднім інгібуванням гесперидином.

Матеріали і методи дослідження.

Дослідження ґрунтується на визначенні активності ХЕ сироватки крові людини *ex vivo*, використовуючи модифікований метод Еллмана. Даний метод базується на здатності тіохоліну – продукту ХЕ реакції – відновлювати калій гексаціаноферат (III), який забарвлений в жовтий колір, до калій гексаціаноферат (II), який практично незабарвлений. Це дозволяє проводити пряму фотометричну реєстрацію швидкості ферментативної реакції.

Для проведення кінетичного дослідження використовували наступні матеріали та обладнання: УФ-спектрофотометр Optizen POP (Mecasys, Південна Корея), кювета з кварцового скла з товщиною оптичного шару 1 см: водяний термостат; одно каналні автоматичні дозатори 50, 200, 1000 мкл; спирт ізопропіловий; таймер.

Реактиви: реактив А: буфер фосфатний (рН=7.6) – 90 ммоль/л; гексаціаноферат калію (III) (Sigma- Aldrich, США) – 2,4 ммоль/л; реактив Б (субстрат); бутирилтіохолін йодид – 30 ммоль/л (ТСІ, Японія); розчин імовірного інгібітору ХЕ (гесперидин) – 25, 50, 100 мкМ; гесперидин (Chemieliva Pharmaceutical Co.); диметилсульфоксид (100%); параоксон (0,01 мкМ; 0,005 мкМ; 0,0025 мкМ), зразок сироватки крові людини. Під час проведення досліду використовувалась контрольна сироватка ERBA NORM (Чехія, Erba Lachema s.r.o.), виготовлена з сироватки людини у вигляді ліофілізату зі

значенням параметрів, що відповідають нормальним або імовірно підвищеним величинам.

Перший дослід виконували наступним чином: вносили в кювету 1050 мкл реагенту А. Додавали до кювети з реагентом А 30 мкл зразку сироватки та 10 мкл параоксона (0,01 мкМ; 0,005 мкМ; 0,0025 мкМ). Кювету зі зразком інкубували протягом 5 хвилин за температури 37°C. Додавали до кювети зі зразком 450 мкл реагенту Б. Виміряли абсорбцію розчину проти води очищеної за довжиною хвилі 405 нм, товщиною оптичного шару 1 см та за температури 37°C. Кожен вимір повторювали три рази.

Другий дослід виконували за наступною методикою: вносили в кювету 30 мкл зразку сироватки та 10 мкл розчину гесперидина (Hes) (50, 100, 200 мкМ). Кювету зі зразком інкубували протягом 5 хвилин за температури 37°C. Додавали до кювети зі зразком 1040 мкл реактиву А та 10 мкл (0,1, 0,05, 0,0025 мкМ) параоксона. Кювету зі зразком знову інкубували протягом 5 хвилин за температури 37°C. Далі додавали 450 мкл розчину реагенту Б та виміряли абсорбцію розчину проти води очищеної за довжиною хвилі 405 нм, товщиною оптичного шару 1 см та за температури 37°C. Кожен вимір повторювали три рази.

Параметри дослідів: довжина хвилі – 405 нм; час – 7 хвилин; інтервал: 30 секунд; поправочний коефіцієнт: 0,5405405 ммоль/л.

Результати дослідження.

За результатами дослідження були побудовані діаграми зміни активності бутирилхолінестерази в присутності параоксона та з попереднім додаванням гесперидина.

Зміну активності ХЕ сироватки крові людини після додавання параоксона (0,01; 0,005; 0,0025 мкМ) показано на рисунку 1.

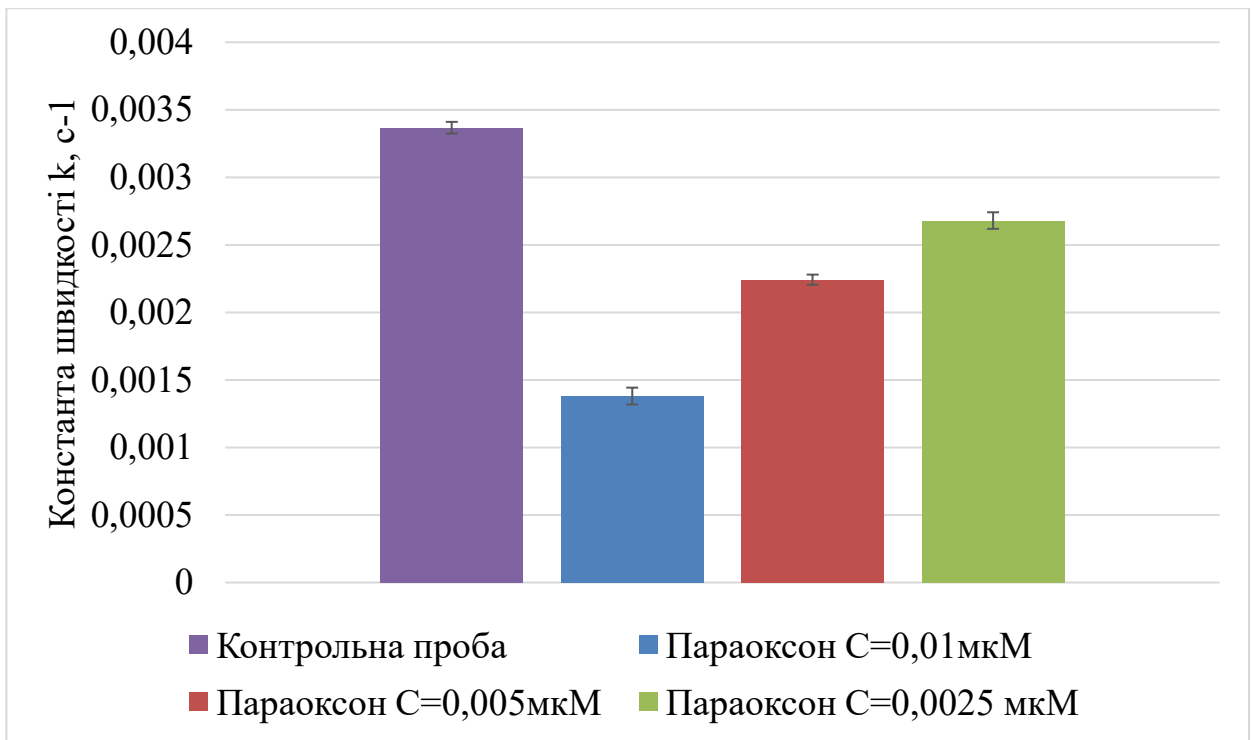


Рисунок 1. Зміна активності бутирилхолінестерази сироватки крові людини при додаванні параоксона (0,01; 0,005; 0,0025 мкМ).

Як видно з рис. 1, навіть невелика кількість параоксона веде до значного інгібування ХЕ. Важливим моментом при використанні параоксона є те, що він являється необоротним інгібітором. Параоксон захоплює активний центр холінестерази і утворює з нею міцний ковалентний зв'язок. Після цього відбувається фосфорилювання каталітичних груп активного центру ферменту. Як наслідок, молекули ферменту, пов'язані з інгібітором, не можуть зв'язуватися з субстратом і це призводить до важкого отруєння організму.

Зміна активності бутирилхолінестерази сироватки крові людини в присутності параоксона (0,01 мкМ) та з попереднім додаванням гесперидина (50; 100; 200 мкМ) представлена на рисунку 2.

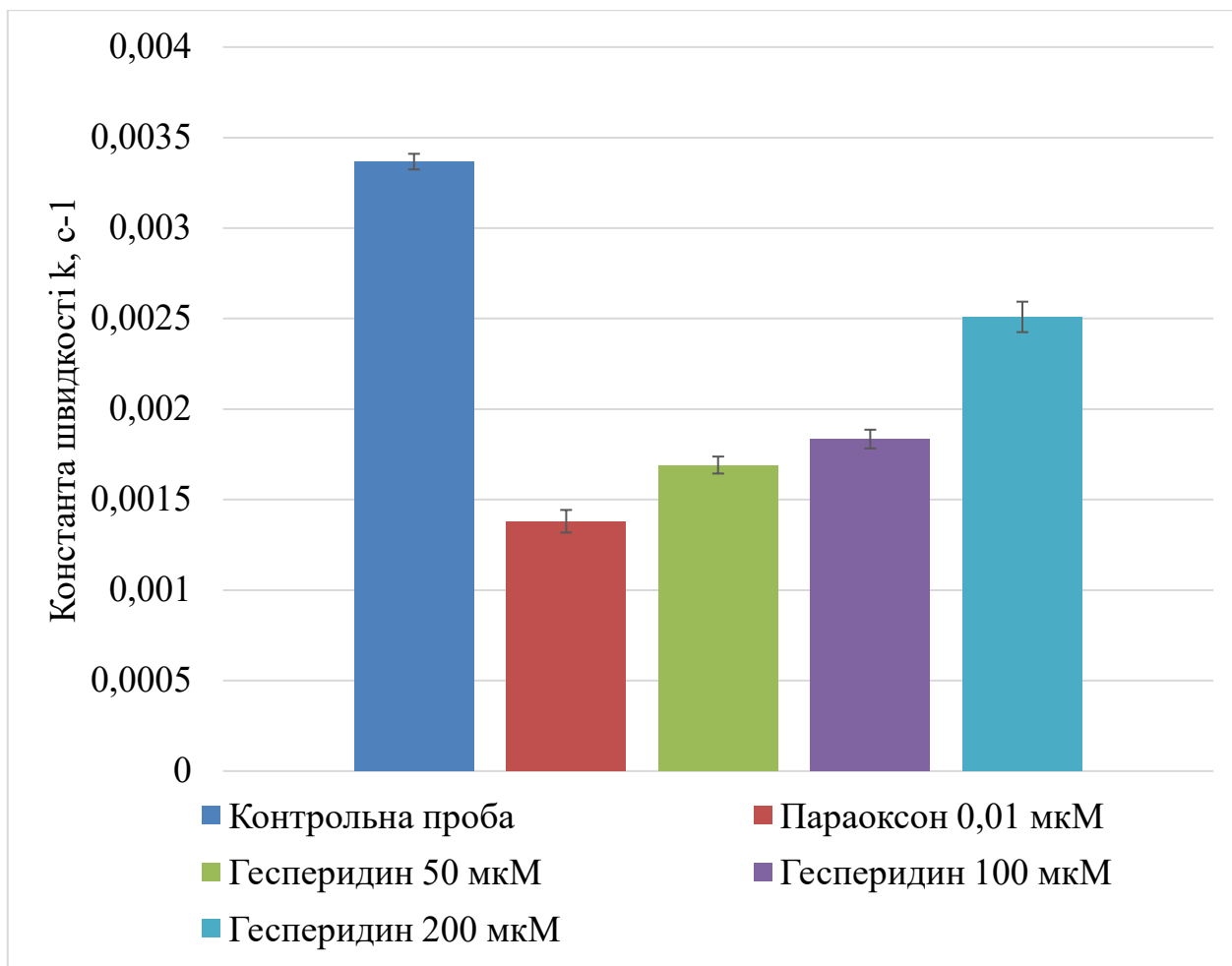


Рисунок 2. Зміна активності бутирилхолінестерази сироватки крові людини в присутності параоксона (0,01 мкМ) та з попереднім додаванням гесперидина (50; 100; 200 мкМ).

При додаванні параоксона, активність ХЕ різко знизилась. Але в наступному досліді, при попередньому додаванні в систему гесперидина, ступінь інгібування ХЕ параоксоном зменшується майже на 45%. Як ми бачимо, чим більша концентрація гесперидина, тим вища активність холінестерази. Гесперидин являється оборотнім інгібітором. При попередньому додаванні гесперидина в сироватку крові, перший зв'язується з активним центром бутирилхолінестерази і при цьому не залишає місця для параоксона. Так як гесперидин – оборотній інгібітор, він виходить із активного центра ХЕ і активність фермента знову відновлюється.

Висновки.

Аналіз результатів спектрофотометричного дослідження активності бутирилхолінестерази показує, що навіть невелика кількість параоксона веде до значного інгібування холінестерази. В наступних дослідах, при попередньому додаванні в систему гесперидина, ступінь інгібування ХЕ параоксоном зменшується майже на 45%.

Список літератури.

1. Zhang X. Pesticide poisoning and neurobehavioral function among farm workers in Jiangsu, People's Republic of China / X. Zhang [at al.] // *Cortex*. – 2016. – №74. – P. 396-404.
2. Mostafalou S. Pesticides: an update of human exposure and Toxicity / S. Mostafalou., M. Abdollahi // *Arch Toxicol*. – 2017. – №91. – P. 549-553.
3. Liu J. Pesticide exposure and child neurodevelopment: summary and implications / J. Liu., E. Schelar // *Workplace health & safety*. – 2012. – №60. – Vol. 5. – P. 235-242.
4. Coskun R. A retrospective review of intensive care management of organophosphate insecticide poisoning: single center experience / R. Coskun. [at al.] // *Niger. J. Clin. Pract.* – 2015. – P. 644-650.
5. Hou YH. An analysis of the clinical and epidemiological characteristics of acute poisoning patients in a general hospital / YH. Hou [at al.] // *Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi*. – 2016. – №34. – Vol.7. – P. 506-509.
6. Li Y. Clinical toxicology in China: current situation and future development / Y. Li. [at al.] // *Clini toxicol*. – 2009. – №47. – P. 263–269.