**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

**ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

Кафедра фізіології,імунології і біохімії

з курсом цивільного захисту та медицини

**Кваліфікаційна робота**

магістра

на тему: *Біологічна активність природних та синтезованих біологічно активних речовин*

Виконала: студентка ІІ курсу, групи 8.0918-2б-з

спеціальності 091 Біологія

освітньої програми Біологія

Мананкіна Ю.Г.

Керівник к.б.н. старший викладач Клімова О.О.

Рецензент к.б.н. старший викладач Литвиненко Р.О.

Запоріжжя

2020 року

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

**ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

|  |
| --- |
| Біологічний факультет |
| Кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та медицини |
| Рівень вищої освіти   магістр |
| Спеціальність   091 Біологія |
| Освітня програма   Біологія |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **ЗАТВЕРДЖУЮ** | | |  | |
| Завідувач кафедри | | | В.Д.Бовт | |
| \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ | | | | |
| “\_\_\_” |  | \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ | | 2019року |

|  |
| --- |
| **ЗАВДАННЯ**  НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТЦІ |
| Мананкіній Юлії Георгіївні |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1. Тема роботи | | Біологічна активність природних та синтезованих біологічно | | | | | | | | | |
| активних речовин. | | | | | | | | | | | |
| керівник роботи | | | Клімова Олена Олександрівна, страший викладач, к.б.н. | | | | | | | | |
| затверджена наказом ЗНУ від | | | | | « | 24 | » | травня | 2019 р. | № |  |
| 2. Строк подання студентом роботи | | | | | | | грудень    2019року | | | | |
| 3. Вихідні дані до роботи | | | | Літературний огляд за обраним напрямком | | | | | | | |
| дослідження | | | | | | | | | | | |
| 4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно | | | | | | | | | | | |
| розробити): | Вивчити біологію лабораторних щурів і склад периферичної крові в | | | | | | | | | | |
| активний. Експериментальний період її онтогенезу (5,6 місяців). 2. Вивчити | | | | | | | | | | | |
| біологію медичної п’явки і склад біологічно активних речовин її слини. 3.Взяти | | | | | | | | | | | |
| участь в експерименті по вивченню складу периферичної крові щура з ранки | | | | | | | | | | | |
| після герудопунктури та з шлунку медичної п’явки після годування на тварині. 4. Вивчити кількість лейкоцитів, формулу крові та кількість еритроцитів в отриманих зразках крові з ранки щура та шлунку медичної п’явки. 5.За допомогою програми PASS провести прогнозування біологічної активності | | | | | | | | | | | |
| для 6-бромпохідних-4-тіохіноліну та сполук які містять в шостому положенні | | | | | | | | | | | |
| етоксигрупи та метоксигрупи. 6. Дослідити у 6-бромпохідних-4-тіохіноліну | | | | | | | | | | | |
| гостру токсичність, антиоксидантну активність та дію на загальну кількість | | | | | | | | | | | |
| лейкоцитів і лейко граму. 7. Зіставити результати комп’ютерного прогнозу з | | | | | | | | | | | |
| експериментальними даними. 8. Дослідити у хронічному експерименті загальну | | | | | | | | | | | |
| кількість лейкоцитів та лейкоцитарну формулу крові у сполуки з вираженою | | | | | | | | | | | |
| антиоксидантною дією. | | | | | | | | | | | |
| 5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень): | | | | | | | | | | | |
| таблиця 3.1-3.18 | | | | | | | | | | | |

6. Консультанти розділів роботи

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Розділ | Консультант | Підпис, дата | |
| завдання  видав | завдання прийняв |
| 1-3 | Фролов О.К., д.м.н. професор |  |  |
| 4 | Амінов Р. Ф., викладач |  |  |

7. Дата видачі завдання

**КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| № з/п | | Назва етапів кваліфікаційної роботи | | | | Строк виконання етапів роботи | | | Примітка | |
| 1. | | Поповнення джерел літератури з теми кваліфікаційної роботи | | | | Травень 2019 року | | | Виконано | |
| 2. | | Оформлення розділу з огляду літератури | | | | Червень – Липень 2019 року | | | Виконано | |
| 3. | | Формування розділу «Матеріали та методи дослідження» | | | | Серпень 2019 року | | | Виконано | |
| 4. | | Експеримантальні дослідження | | | | Вересень – Жовтень 2019 року | | | Виконано | |
| 5. | | Статистичний аналіз експериментальних даних | | | | Листопад 2019 року | | | Виконано | |
| 7. | | Формування експериментальної частини, оформлення кваліфікаційної роботи | | | | Грудень 2019 року | | | Виконано | |
| 8. | | Оформлення матеріалів до захисту, попередній захист кваліфікаційної роботи | | | | Січень 2019року | | | Виконано | |
| Студент | |  |  | |  | Ю. Г. Мананкіна | | |
|  | |  |  | |  |  | | |
| Керівник роботи | |  |  | |  | О.О.Клімова | | |
|  | |  |  |  | | |
| **Нормоконтроль пройдено** | | | | | | | | |
| Нормоконтролер | |  |  | |  | Р. Ф. Амінов | | |

РЕФЕРАТ

Робота викладена на 72 сторінках друкованого тексту, містить 18 таблиць, 8 рисунків. Перелік посилань включає 49 джерела.

Об’єктом дослідження − капілярна кров з ранки щура та шлунку медичної п’явки, 6-бромпохідні-4-тіохіноліну.

Мета роботи: вивчити склад капілярної крові лабораторних щурів і з'їденої шлункової крові у п'явки в ході герудологічного контакту, за допомогою комп’ютерної програми PASS провести пошук біологічно активних сполук серед 6-бромпохідних-4-тіохіноліну та експериментально дослідити деякі перспективні види дії.

Методи досліджень: комп’ютерний, біохімічні, статистичні.

У результаті дослідження встановлено, що збільшення форменних елементів в шлунку медичної п’явки є результатом їх філогенетичного пристосування як абсолютного гемофага. Виявлено, що 6-бромпохідні-4-тіохіноліну мають помірну антиоксидантну дію, що підтверджує комп’ютерний прогноз. Речовина 2-метил-6-бром-4-S-хінолін пригнічує показники лейкограми в хронічному експерименті.

Новизна роботи. Вперше проведено порівняльний аналіз кількості форменних елементів з витікаючої та відцідженої з ШКТ МП крові щура одразу після годування МП. Вперше виявили, що повторні гірудопунктури збільшують капілярне кровопостачання в регіональні органи. В дослідах in vitro та in vivo вперше досліджені деякі прогнозовані види біологічної активності 6-бромпохідних-4-тіохіноліну.

Значущість роботи полягає в використанні отриманих результатів для

подальшого поглибленого вивчення ефективності герудотерапії та дослідження 6-бромпохідних-4-тіохіноліну, як біологічно активних речовин.

ГІРУДОПУНКТУРА, ГІРУДОВПЛИВ, МЕДИЧНА П’ЯВКА, 6-БРОМПОХІДНІ-4-ТІОХІНОЛІНУ, ГОСТРА ТОКСИЧНІСТЬ, АНТИОКСИДАНТНА ДІЯ, PASS.

ABSTRACT

   The work is presented in 72 pages of printed text, contains 18 tables, 8 drawings. The list of links includes 49 sources.

   The subject of the study was capillary blood from the wound of the rat and the stomach of the medical leech, 6-bromo-4-thioquinoline, as well as the blood of rats to determine the leukogram of the blood and the mouse to determine acute toxicity.

Purpose: To study the capillary blood composition of laboratory rats and gastric blood in leeches during herudological contact, using the PASS computer program to search for biologically active compounds among 6-bromo-4-thioquinoline and to experimentally investigate some promising species actions.

Research methods: computer, biochemical, statistical.

The study found that the increase in the shape elements in the stomach of the medical leech is the result of their phylogenetic adaptation as an absolute hemophage; the use of computer-based prediction of the biological effects of compounds with subsequent experimental testing saves time and effort in finding new biologically active substances. It has been found that 6-bromo-4-thioquinoline has a moderate antioxidant effect, and 2-methyl-6-bromo-4-S-quinoline inhibits leukograms in a chronic experiment.

Novelty of work. For the first time, a comparative analysis of the number of shaped elements from the leaking and drained from the gastrointestinal tract of MP blood of the rat immediately after feeding the MP. According to the results of a computer prediction, in vitro and in vivo experiments, for the first time, some probable types of biological activity of 6-bromo-4-thioquinoline were investigated.

The importance of the work is to use the results obtained for further in-depth study of the effectiveness of gerudotherapy and the study of 6-bromo-4-thioquinoline as biologically active substances.

HIRUDOPUNCTURE, HYRUDO INFLUENCE, MEDICAL LEECH, 6-BROMPOHIDANE-4-THIOCHINOLINE, ACUTE TOXICITY, ANTIOXIDANT ACTION, PASS.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ……………………………………………………………………………..8

ВСТУП………………………………………………………………………………….9

1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ……………………………………………….13

1.1 Біологія лабораторних щурів…………………………………………………….13

1.2 Біологія і видове різноманіття медичної п´явки………………………………..14

1.3.Біологічно активні речовини…………………………………………………….16

1.4 Біологічно активні речовини медичної п´явки…………………………………18

1.5.Біологічно активні речовини на основі хіноліну……………………………….21

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ…………………………………22

2.1 Об'єкт дослідження………………………………………………………………22

2.2.Методи дослідження……………………………………………………………..22

2.2.1 Методика відбору крові з ранки щура після гірудопунктури……………….22

2.2.2 Методика забору крові з шлунку медичної п’явки…………………………..23

2.2.3 Методика підрахунку загальної кількості лейкоцитів у рахунковій камері Горяєва…………………………………………………………………………………23

2.2.4 Мікроскопія мазків крові. Складання лейкоцитарної формули……………..25

2.2.5 Методика підрахунку кількості еритроцитів…………………………………27

2.2.6 Розрахунок абсолютної кількості окремих лейкоцитів……………………28

## 2.2.7 Дослідження гострої токсичності……………………………………………28

## 2.2.8 Дослідження антиоксидантної активності……………………………………29

2.3 Статистична обробка експериментальних даних……………………………….30

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА……………………………………………..32

3.1 Результати порівняння кількості лейкоцитів та еритроцитів………………….32

3.2 Структура синтезованих речовин……………………………………………….37

3.3 Прогноз біологічної дій сполук, які вивчаються……………………………….40

3.4 Результати досліджень гострої токсичності……………………………………47

3.5 Антиоксидантна активність похідних 2-метил-6-бромхінолінів……………...48

3.6 Результати експериментального підтвердження комп’ютерного прогнозу….49

3.7 Динаміка відносної кількості лейкоцитів крові щурів у хронічному експерименті при уведенні 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти……….51

3.8 Динаміка абсолютної кількості лейкоцитів крові щурів у хронічному експерименті при уведенні 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти……….53

4 ОХОРОНА ПРАЦІ………………………………………………………………….56

ВИСНОВКИ…………………………………………………………………………..61

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦЇЇ……………………………………………………63

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ……………………………………………………………….64

ДОДАТКИ ……………………………………………………………………………68

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АОА – антиоксидантна активність

АРА – антирадикальна активність

БАР – біологічно активні речовини

ВР – вільні радикали

ВРО – вільнорадикальне окиснення

ГВ – гірудовплив

ГП – гірудопунктура

МП – медична п’явка

СОД – супероксиддисмутаза

СОР – супероксид-радикал

ЦНС – центральна нервова система

ШКТ - шлунково кишковий тракт

PASS – Prediction Activity Spectra for Substances (прогноз активності спектра сполук)

ВСТУП

Біологічно активні речовини (БАР) – це сполуки, які внаслідок своїх фізико-хімічних властивостей мають певну специфічну активність і виконують, змінюють або впливають на каталітичну, енергетичну, пластичну, регуляторну та інші функції у організмі.

В науковому значенні БАР використовують для підвищення активності життєвих процесів організму. Іншими словами, біологічна дія – це біохімічні, фізіологічні, генетичні та інші зміни, що відбуваються у живих клітинах та організмі в результаті дії БАР.

Взагалі, повністю індиферентних речовин у природі немає. Всі речовини виконують певні функції в організмі людини, тварин, рослин або використовуються для досягнення певних ефектів.

Натепер відомий широкий спектр БАР різноманітного призначення, які можуть бути отримані або з природних живих організмів, або синтезовані з допомогою різноманітних хімічних перетворень. Це антибіотики, вакцини, ферменти, полісахариди, гормони, глікозиди, кормові та харчові добавки, білки, амінокислоти, вітаміни, алкалоїди, пестициди, дефоліанти та ін.

БАР бувають природні та синтетичні. Природні БАР утворюються в процесі життєдіяльності живих організмів. Вони можуть утворюватись у процесі обміну речовин, виділятись в оточуюче середовище (екзогенні) чи накопичуватись всередині організму (ендогенні).

До екзогенних природних БАР належать: коліни, фітонциди, антибіотики, маразміни, мікотоксини, духмяні речовини. До ендогенних БАР можна віднести: білки, жири, вуглеводи, амінокислоти, вітаміни, ферменти, гормони, барвники.

Вищезгадані природні БАР можуть бути отримані синтетичним шляхом. Ефективність синтезу БАР залежить від фізіологічних особливостей живих організмів та екологічних факторів.

Медичні препарати теж є БАР, ендо- чи екзогенними, законодавчо дозволені для профілактики і лікування захворювань людини. Ці речовини при певних концентраціях повинні мати чітко виявлені бактерицидну, антисептичну, наркотичну, дезинфікуючу чи інші дії. Терапевтичний ефект медичних препаратів здійснюють і БАР, які утворюються у організмі рослин, тварин і людини.

Прикладом природних БАР в нашому випадку служать БАР п’явки, які використовуються у гірудотерапії. Герудологія і герудотерапія в даний час займає значні позиції в терапевтичному напрямку лікування і профілактики патологій, особливо при їх хронізації і переході в імунопатологію.

Однак традиційна герудотерапія залишається емпіричною за обсягом приставок п´явок. Тривалість курсів лікування що ускладнює включення цього виду лікувальної профілактики впливає в протокольну медицину. Причиною даних обмежень є невивчені більшості механізмів терапевтичних проявів герудотерапії. Один з провідних механізмів герудотерапії це корекція імунітету у тварин в тому числі і у людини.

Однак механізм даної корекції тільки починає вивчатися, для вивчення даного механізму використовуються роботи останніх років в лабораторії співробітників клітинної та органічної біотехнології науково дослідного сектора ЗНУ.

Особливий інтерес представляє вивчення місцевого імунітету в системі «ектопаразит (медична п'явка) господар годівник (ссавці, людина)» яка є клітинною основою герудотерапевтичних ефектів.

Прикладом синтетичних БАР у даному випадку виступають похідні хіноліну. Актуальними вони є тому, що хімічні речовини тестуються лише на невелике число необхідних видів біологічної активності, а властивості виявлених "базових структур " у наступному оптимізуються шляхом синтезу і дослідження їхніх аналогів. При цьому багато видів біологічної активності, властивій досліджуваній речовині , але які є “побічними” стосовно обраного напрямку досліджень, залишаються невивченими. У той же час наявність у речовини багатьох видів біологічної активності є типовим. Деякі з цих видів активності виявляються згодом як побічні токсичні ефекти, а інші стають підставою для реєстрації препарату по новому призначенню. Таким чином, мається визначене протиріччя між твердою спрямованістю процесу дослідження нових біологічно активних сполук і множинністю біологічних ефектів, які виявляються потенційно кожною речовиною. Жодну хімічну сполуку неможливо досліджувати експериментально на усі відомі види активності [1], навіть якщо взяти до уваги можливості сучасного високо - продуктивного (hіghthroughput) скринінга, оскільки скринінг також здійснюється направлено, стосовно однієї чи декількох біологічних мішеней дії майбутніх ліків, розглянутих як перспективні в конкретний період часу [3]. Єдина реальна можливість комплексного дослідження біологічної активності речовин ― розвиток нових технологій комп'ютерного прогнозування і їхнє застосування до оцінки ймовірних видів активності хімічних сполук з наступним тестуванням досліджуваних речовин відповідно до результатів прогнозу.

В якості «базової структури» була обрана гетероциклічна система хіноліну, похідні якого знайшли широке застосування в медицині як антималярійні і антимікробні засоби [3,4]. Окрім цього похідні хіноліну також володіють протизапальним, анальгезуючим, протипухлинним, нейротропним і іншими видами активності [5-7].

Похідні хіноліну застосовуються в якості лікарських препаратів, що володіють широким спектром фармакологічного дії [8, 40]. Гетероциклічна система хіноліну є основою для багатьох природних і синтетичних лікарських засобів, що володіють різноманітними видами антибактеріальної, фунгістатичной та протипаразитичної активності, в зв'язку з цим система і до нині є предметом пильної уваги дослідників в плані пошуку біологічно активних речовин.

Мета роботи: вивчити склад капілярної крові лабораторних щурів і з'їденої шлункової крові у п'явки в ході герудологічного контакту, за допомогою комп’ютерної програми PASS провести пошук біологічно-активних сполук серед 6-бромпохідних-4-тіохіноліну та експериментально дослідити деякі перспективні види дії.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Вивчити біологію лабораторних щурів і склад периферичної крові в активний експериментальний періоді її онтогенезу (5,6 місяців). Вивчити біологію медичної п'явки і склад біологічно активних речовин її слини.

2. Взяти участь в експерименті по вивченню складу периферичної крові щура з ранки після герудопунктури та з шлунку медичної п’явки після годування на тварин.

3. Вивчити кількість лейкоцитів, формулу крові та кількість еритроцитів в отриманих зразках крові з ранки щура та шлунку медичної п’явки.

4. За допомогою програми PASS провести прогнозування біологічної активності для 6-бромпохідних-4-тіохіноліну та сполук які містять в шостому положенні етоксигрупи та метоксигрупи. Дослідити у 6-бромпохідних-4-тіохіноліну гостру токсичність, антиоксидантну активність та дію на загальну кількість лейкоцитів і лейкограму. Зіставити результати комп’ютерного прогнозу з експериментальними даними.

5. Дослідити у хронічному експерименті загальну кількість лейкоцитів та лейкоцитарну формулу крові у сполуки з вираженою антиоксидантною дією.

Данні дослідження були апробовані на регіональної науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Актуальні проблеми та перспективи розвитку природничих, медичних та фармацевтичних наук»

1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Біологія лабораторних щурів

Лабораторні щури відносяться до виду сірих щурів (Rattus norvegicus), що утримуються та розводяться з метою проведення наукових досліджень переважно в областях фізіології і медицини [11].

Інбредні і Аутбредні лінії щурів Аутбредні (безпородні) лінії є закритими популяціями більш-менш гетерогенних тварин. Нові в'язки встановлюються або випадковим чином, або шляхом застосування циклової схеми, що мінімізує коефіцієнт інбридингу. Випадкові в'язки означають, що тварини вибираються для розведення без урахування ступеня їх спорідненості, але популяція закрита для потрапляння нового генетичного матеріалу ззовні.

Метою випадкового схрещування також є зменшення інбридингу і його наслідків, тобто підтримка генетичної мінливості. В основі схем циклічного схрещування лежить ідея про збереження генетичної мінливості настільки, наскільки це можливо, з метою імітації генетичного складу людської популяції. Найбільшою перевагою таких ліній є їх гібридна сила і, як стверджується в різних публікаціях, висока тривалість життя, висока опірність інфекціям, раннє настання фертильності, часте і численне потомство, низька неонатальна смертність, швидке зростання і великі розміри. Факторами, які сильно впливають на гетерогенність аутбредних ліній, є їх ефективний розмір популяції, послідовність поколінь, вибір майбутніх батьків і використовуваної системи розмноження. Лінії, отримані від щурів Вістар і Спрег-Доулі, є найбільш поширеними експериментально використовуваними щурами незалежно від того, що їх набір генів може відрізнятися через ефект засновника і генетичного дрейфу. Це треба враховувати при використанні щурів таких ліній.

Інбредні (чисті) лінії - група організмів, що мають певні ознаки, які повністю передаються потомству в силу генетичної однорідності всіх особин. У разі гена, що має кілька алелей, всі організми, що відносяться до однієї чистої лінії, є гомозиготними по одному і тому ж аллелі даного гена. Стандартні інбредні лінії виходять шляхом в'язки як мінімум 20 послідовних поколінь брата і сестри або батька особиною з потомства. В результаті тварини, що становлять чисту лінію, отримують однакові копії хромосом кожної з гомологічних пар. Генетична однорідність є одним з фундаментальних властивостей інбредних ліній: вона забезпечує більшу ступінь стандартизації (знижує ймовірність впливу на результат дослідження генетичних відмінностей між особинами) і підвищує якість досліджень. З цієї причини багато дослідників використовують виключно генетично чисті інбредні лінії і їх похідні. За допомогою традиційної селекції і методів генної інженерії отримано безліч чистих ліній з заданими властивостями, які використовуються для конкретних досліджень [10].

1.2 Біологія і видове різноманіття медичної п'явки

Медична п'явка (лат. Hirudo medicinalis) - вид кільчастих хробаків підкласу п'явок, застосовуваний в Європі з медичними цілями. У Латинській Америці використовується інший вид - Hirudinaria manillensis, в Північній Америці - Macrobdella decora [16].

Паразит, що харчується кров'ю людини і тварин, корисні властивості якого відомі людям з найдавніших часів. У дикому вигляді зустрічається в Європі практично повсюдно, хоча чисельність в багатьох регіонах багаторазово скоротилася через промисловий вилов в минулому, осушення боліт і забруднення води.

Має округле сплющене тіло з двома присосками на задньому і передньому кінці, в центрі передньої присоски розташований ротовий отвір. Підстерігає жертву сидячи у воді, прикріпляється до очерету або корчів. За одне годування п'явка може висмоктати крові в 6 разів більше своєї ваги. Висмоктана кров зберігається в шлунку в рідкому стані місяцями, не звертаючись, а жити від годування до годування п'явка може до двох років [19].

У Російській медицині використовується в живому вигляді при лікуванні багатьох захворювань: варикозу, геморою, ран, трофічних виразок та ін., В Європі і США – в основному в мікро- і пластичнї хірургії для зняття венозного застою пересаджених тканин. Використовуються також екстракти медичної п'явки і препарати на їх основі, екстракт слинних залоз медичної п'явки. . В останні роки створені рекомбінантні препарати біологічно активних речовин п'явки (гірудин, гірудостазін, бделластазін і ін.) І навіть спроби сконструювати штучну п'явку [17,18].

Перетравлювати висмоктану кров і зберігати її в рідкому вигляді п'явці допомагають бактерії-симбіонти Aeromonas hydrophila (англ.) знаходяться в кишечнику. Вони ж допомагають їй впоратися з чужорідними бактеріями, які можуть потрапити в шлунок разом з кров'ю хворої тварини.

Запліднення внутрішнє, відразу після нього п'явки відшукують місце на березі поблизу берегової лінії для відкладання кокона. Одна п'явка може відкласти до 4 - 5 коконів, вони мають овальну форми і покриті зовні губчастої оболонкою. Усередині кокона є білкова маса для харчування ембріонів, кількість яких може бути до 20 - 30, їх розвиток до вилуплення займає 2 - 4 тижні. Що вилупилися маленькі п'явки є мініатюрні копії дорослих особин і вже готові харчуватися кров'ю. Годуються вони в основному на жабах, тому що не можуть прокусити ще шкіру ссавців [17].

Застосування живих п'явок. Живі п'явки приставляються безпосередньо до тіла людини за спеціально розробленими схемами. Вибір місця приставки визначається багатьма факторами: захворюванням, гостротою процесу, станом хворого. Процес смоктання триває від 10 - 15 хвилин до години, після чого п'явки знімаються за допомогою спирту, йоду, або, в разі годування досхочу, відпускають самі. Ситі п'явки підлягають знищенню приміщенням в розчин хлораміну, повторне застосування їх не допускається. Лікувальний ефект від впливу живих п'явок обумовлений декількома факторами:

– дозувати кровоспускання (від 5 до 15 мл крові);

– дія біологічно активних речовин слини п'явки;

– комплексом відповідних реакцій організму.

Можливість передачі інфекції через п'явку виключена, якщо з моменту останнього годування пройшло більше 4 місяців. До цього часу в шлунку п'явки залишається незначна кількість крові, а можливе зростання патогенних бактерій встигає вдавитися бактерією-симбіонтом Aeromonas hydrophila. Титр її самої падає, і при смоктанні вона не потрапляє в ранку. Однак у ослаблених хворих зі зниженим імунітетом, або на шматках пересадженої тканини зі зниженням місцевих захисних механізмів, все-таки може відбуватися інфікування Aeromonas. Для профілактики розвитку цієї інфекції після пластичних операцій в США рекомендовано проводити курси антибіотикотерапії препаратами фторхінолонового ряду (ципрофлоксацин).

Надійною гарантією захисту від перенесення п'явкою інфекційних агентів служить використання вирощених в штучних умовах і голодуванні достатній час тварин, в кишечнику яких немає патогенної флори [24].

1.3 Біологічно активні речовини

Біологічно активні речовини (БАР) – (грец. bios – життя, що означає звязок із життєвими процесами і відповідає слову «біол.» + лат. activus – активний,тобто речовина, яка має біологічну активність) – це сполуки, які внаслідок своїх фізико-хімічних властивостей мають певну специфічну активність і виконують, змінюють або впливають на каталітичну (ферменти, вітаміни, коферменти), енергетичну (вуглеводи, ліпіди), пластичну

(вуглеводи, ліпіди, білки), регуляторну (гормони, пептиди) або інші функції в

організмі.

Зміст словосполучення може суттєво змінюватися залежно від сфери застосування. В науковому значенні (нейрофізіологічному, психічному, хімічному процесах) – підвищення активності життєвих процесів організму.

Іншими словами, біологічна дія – це біохімічні, фізіологічні, генетичні та інші зміни, що відбуваються у живих клітинах та організмі в результаті дії БАР.

Взагалі, повністю індиферентних речовин у природі нема. Всі речовини

виконують якісь функції в організмі людини, тварин, рослин або використовуються для досягнення певних ефектів. Наприклад вода, повязана з

метаболічними функціями живої клітини, є активним учасником транспортування поживних речовин та продуктів обміну в організмі, субстрактом низки ферментативних реакцій [21].

На теперішній час відомий широкий спектр БАР різноманітного призначення, які можуть бути отримані або з природних живих організмів, або синтезовані з допомогою різноманітних хімічних перетворень. Це антибіотики, вакцини, ферменти, полісахариди, гормони, глікозиди, кормові та харчові добавки, білки, амінокислоти, вітаміни, алкалоїди, пестициди, дефоліанти та ін.

БАР бувають природні та синтетичні. Природні БАР утворюються в процесі життєдіяльності живих організмів. Вони можуть утворюватись у процесі обміну речовин, виділятись в оточуюче середовище (екзогенні) чи накопичуватись всередині організму (ендогенні).

До екзогенних природних БАР належать: коліни, фітонциди, антибіотики, маразміни, мікотоксини, духмяні речовини. До ендогенних БАР можна віднести: білки, жири, вуглеводи, амінокислоти, вітаміни, ферменти, гормони,барвники.

Вищезгадані природні БАР можуть бути отримані синтетичним шляхом.

Ефективність синтезу БАР залежить від фізіологічних особливостей живих організмів та екологічних факторів.

Медичні препарати теж є БАР, ендо- чи екзогенними, законодавчо дозволені для профілактики і лікування захворювань людини. Ці речовини при певних концентраціях повинні мати чітко виявлені бактерицидну, антисептичну, наркотичну, дезинфікуючу чи інші дії. Терапевтичний ефект медичних препаратів здійснюють і БАР, які утворюються у організмі рослин, тварин і людини (алкалоїди, гормони, вітаміни, антибіотики) .

До БАР також належать пестициди та отрути, які шкідливо діють на живіорганізми, є токсичними та отруйними для них, наприклад алкалоїди (нікотин,анабазин, фізостигмін); піретрини (із квітів далматської ромашки), ротенон.

1.4 Біологічні активні речовини медичної п'явки

Позитивна дія гірудотерапії зумовлена біологічно активними речовинами (БАР), які продукуються медичними п’явками і виділяються ними у кровообіг при кровосмоктанні. Медична п’явка є джерелом ряду біологічно активних речовин. Деякі з них не мають аналогів, тобто можуть бути виділені тільки з п’явки. П’явка є джерелом наступних біологічно активних речовин [22]:

– гіалуронідаза – фермент, який забезпечує реакції гідролітичного розщеплення і деполімеризації гіалуронової кислоти та споріднених їй сполук. Гіалуронідаза і колагеназа – це ферменти, які збільшують проникнення до організму різних речовин. Завдяки їм інші біологічно активним речовинам, які входять до складу слини медичних п’явок, потрапляють в організм при засмоктуванні крові п’явкою. Ці ферменти мають бактерицидну і навіть бактеріостатичну дію;

– гірудин вперше виділив Хайкрафт з екстракту п’явок. До відкриття гепарину гірудин у складі екстракту головної частини п’явок широко використовували як антикоагулянт. Гірудин має виключно високу специфічність до тромбіну, взаємодіє з ним з утворенням неактивного комплексу. Інгібування активності тромбіну гірудином проявляється уповільненням чи повним блокуванням згортання фібриногену. Крім того, у присутності гірудину уповільнюється реакція активації тромбіном факторів V, VІІІ, ХІІІ згортання крові. Гірудин перешкоджає реакції вивільнення і агрегації тромбоцитів, пригнічуючи зв’язування тромбіну з тромбоцитами, оскільки ідентичність тромбіну до гірудину вище, ніж до рецепторів на тромбоцитах. Деякі властивості гірудину роблять його перспективним для лікування серцево-судинних захворювань. Через складності одержання цього препарату з п’явок у достатній кількості його використання в медицині є обмеженим. У теперішній час є спроби одержання гірудину методами генної інженерії;

– псевдогірудин – неактивний компонент, супутня речовина, яка виділяється разом з гірудином при його одержанні з цільних медичних п’явок. Функціональна роль псевдогірудину не встановлена;

– бделліни – високомолекулярні білки, інгібітори трипсину і плазміну – вперше були виявлені у 1969 році в комерційних препаратах грудину;

– егліни – високомолекулярні білки – за своєю біохімічною дією є інгібіторами α-хімотрипсину, субтилізіну та нейтральних протеаз гранулоцитів людини: еластази і катепсину G. Пригнічуючи ці ферменти, егліни здатні зменшувати відповідь на запалення. Біологічна цінність еглінів залежить від їх здатності блокувати активність лейкоцитарних протеаз, що вивільняються при запаленні. Егліни визначають виражену протизапальну активність п’явок та препаратів з них;

– гістаміноподібна речовина міститься у секреті слинних залоз п’явок. Природа та біологічна роль при гірудотерапії цієї речовини не встановлені;

– апіраза визначає протисклеротичну дію секрету слини п’явок, підвищує активність ферменту ліпопротеїдліпази, в результаті чого в крові людини знижується рівень загального холестерину і β-ліпопротеїдів низької щільності. Саме такою дією пояснюється позитивний вплив як живих п’явок, так і препаратів з БАР п’явок на хворих із різними проявами атеросклерозу;

– дестабілазний комплекс. Дестабілаза ε-(γ-Glu)-Lys ізопептидаза вперше була виявлена у складі секрету слинних залоз Hirudo medicinalis у 1986 році. Фібринолітична активність цього ферменту здійснюється через гідроліз ізопептидних зв’язків, які утворюються при  стабілізації фібрину у присутності фактора ХІІІ згортання крові, зумовлюючи нетрадиційний механізм фібринолізу. В результаті контакту з кров’ю міцелярна структура дестабілази зв’язує вільні гірудин та інгібітор калікреїну плазми крові. Так формується ліпосома. Природна ліпосома – дестабілазний комплекс – є агентом, який забезпечує як профілактичну протитромботичну, так і тромболітичну дію;

– стабільний аналог простацикліну за спектром фізіологічної дії подібний до простацикліну: пригнічує агрегацію тромбоцитів, стимулює викид тканинного активатора плазміногену із судинної стінки, знижує артеріальний тиск;

– брадикініни – поліпептиди, які сприяють підвищенню фагоцитарного індексу і фагоцитарної активності лейкоцитів людини. Саме вони визначають протизапальну дію п’явок;

– ліпосома п’явок – перший приклад такої структури природного походження. Компонентами цієї ліпосоми є дестабілаза, стабільний аналог простацикліну, інгібітор калікреїну плазми крові та гірудин. Залежно від полярності розчинника ліпосома здатна змінювати свою просторову орієнтацію, що забезпечує її безперешкодне проникнення через мембрану клітин.

Окрім наведених вище біологічно активних речовин, медичні п’явки продукують велику кількість таких сполук, як коллагеназа, кініназа, кініногеназа, ліпази, простагландини, які вивчаються в лабораторіях різних країн [18,21,25].

1.5 Синтетичні біологічно активні речовини на основі хіноліну

Гетероциклічна система хіноліну являє собою основу не тільки багатьох природних ФАР, а і синтетичних, що володіють різноманітними видами антибактеріальної, фунгістатичної та фармакологічної дії. Похідні хіноліну широко використовуються як препарати у медичній та ветеринарній практиці, а також відомі, як пестициди та аналітичні реагенти.

В літературі відомо більше 100 лікарських засобів похідних хіноліну. Вони поділяють на такі фармакологічні групи: а) антималярійні препарати, б) антисептики та антипротозойні препарати, в) органотропні препарати, г) інші [5].

Хінолінові алкалоїди стали базою для створення антималярійних засобів. Хінін розглядається в якості шизотропного препарату, котрий діє на безстатеві еритроцитарні форми всіх видів малярійних плазмодіїв. На гамонти й тканеві (екзоритроцитарні) форми збудників хінін дії не проявляє. Хінін також пригнічує ЦНС, знижує збудливість серцевого м'яза, збуджує мускулатуру матки та посилює її скорочення [7]. З уведенням більш важких алкілів в алкоксигрупу в 6-му положенні хіноліну посилюється місцевоанестезуюча дія, але збільшується також і токсичність. Встановлено, що похідні 4-амінохіноліну (хінгамін, гідроксохлорін, галохін) подібно до хініну проявляють шизотропну дію, а похідні 8-амінохіноліну (плазмоцид, хіноцид, примахін) – гаметотропну дію.

Серед антималярійних препаратів похідних хіноліну особливий інтерес викликає хінгамін (делагіл, хлорохін, резохін). Хінгамін чинить шизотоцидну дію і швидко викликає смерть безстатевих еритроцитарних форм усіх видів малярійного плазмодія. Препарат дає також гамонтоцидний ефект. Одним з можливих механізмів дії антималярійних препаратів є підвищення pН цитоплазми, що у свою чергу впливає на перетворення антигенів у макрофагах. Крім того, антималярійні препарати пригнічують синтез 17 інтерлейкіна (ІЛ-1), експресію ІЛ-2 рецепторів та індуковане ІЛ-1 руйнування хряща. Іншою стороною їхньої дії є ослаблення агрегації й адгезії тромбоцитів [5].

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1 Об’єкт дослідження

Об’єктом дослідження природних БАР були 10 нелінійних самок щурів, яким двічі раз на тиждень робили приставку медичної п’явки вагою 0,4-0,5 г. Кожен раз після відпадання медичної п´явки в процесі герудовпливу бралась кров із ранки щура та відціджувалась кров з шлунку п’явки. В кожному зразку крові досліджували кількість лейкоцитів, лейкоцитарну формулу крові та кількість еритроцитів.

Об’єктом дослідження синтетичних БАР були 6-бромпохідні-4-тіохіноліну, активність яких досліджувалась на безпородних білих щурах при визначенні лейкограми крові в хронічному експерименті та безпородних білих мишах для дослідження гострої токсичності. При вивченні лейкограми крові сполуку уводили в дозі 1/10 ЛД50 протягом семи діб. Дослідження крові проводили на другу та сьому добу.

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Метод забору крові з ранки щура після гірудопунктури

Після відпадання п’явки з щура, коли кров починає виділятися, варіпіпеткою відціжують максимальну можливість крові з ранки. Витирають наконечник піпетки від крові та досліджують її. Швидко роблять мазок для формули крові, а залишок не менш 20 мкл, поміщають в 0,38 мл 3% уксусної кислоти. Слідуючий зразок крові з цієї ж ранки, застосовують для підрахунку кількості еритроцитів. Кров набирають в меланжер до мітки 0,5 , протирають його кінчик фільтрувальним папером, потім до заповнюють розчином (3% NaCl).

2.2.2 Метод забору крові з шлунку медичної п’явки

Після того як п’явка відпадає, в ліву руку беруть пінцет та тримають п’явку за задній кінець, в правій руці також повинен міститися пінцет яким проводять по п’явкі згори вниз, тобто переганяють кров від заднього кінця в передній кінець. Таким чином відціджують кров в пробірку з якої беруть зразки крові для підрахунку кількості лейкоцитів, лейкоцитарної формули та еритроцитів.

2.2.3 Підрахунок загальної кількості лейкоцитів у рахунковій камері Горяєва

Підрахунок кількості лейкоцитів входить до складу загального клінічного аналізу крові, а також "укороченого аналізу" крові.

Уніфікований метод підрахунку в рахунковій камері. Принцип - підрахунок лейкоцитів під мікроскопом у певній кількості квадратів рахункової сітки й перерахування на 1 мкл крові (або 1 л по системі СИ), виходячи з об'єму квадратів і розведення крові.

Реактиви: 3 - 5% розчин оцтової кислоти, підфарбований декількома краплями розчину метиленового синього (для забарвлення ядер лейкоцитів).

Спеціальне устаткування: мікроскоп, рахункова камера Горяева.

Хід визначення: розводять досліджувану кров у 20 разів, для цього в суху пробірку наливають 0,4 мл оцтової кислоти. Набирають із пальця 0,02 мл крові. Кінчик піпетки витирають фільтрувальним папером або марлею, стежачи за тим, щоб з піпетки кров не вилилася. Видувають кров з піпетки на дно пробірки, ретельно перемішують (повторно набираючи й видуваючи суміш крові з оцтовою кислотою). Маркірують пробірку й залишають до моменту рахунку (допускається рахунок лейкоцитів не більш ніж через 2 - 4 год після узяття крові).

Готують рахункову камеру із сіткою й покривне скло, потім притирають скло до камери, злегка надавлюючи його таким чином, щоб по краях скла з'явилися райдужні кільця або смуги (це свідчить про висоту камери - 0,1 мм). Заповнюють рахункову камеру розведеною кров'ю: попередньо струшують кілька разів вміст пробірки, потім пастеровской піпеткою або скляною паличкою відбирають краплю розведеної крові й підносять ії к краю покривного скла, стежачи за тим, щоб кров без пухирців повітря рівномірно заповнила всю поверхню сітки, не затікаючи в борозенки. Заповнену камеру залишають у горизонтальному положенні на 1 хвилину (для осідання лейкоцитів). Не міняючи горизонтального положення камери, поміщають її на столик мікроскопа й підраховують лейкоцити в 100 великих квадратах з малим збільшенням (окуляр 10Х, об'єктив 8Х). Для більшої точності рахунок лейкоцитів проводять по всій сітці у великих квадратах (нерозділених на малі квадрати й смуги), починаючи з лівого верхнього кута сітки. Для кращого контрастування затемнюють поле зору, опускаючи конденсор і закриваючи діафрагму. Зчитають клітки розташовані усередині квадрата й лежачі на будь-яких двох лініях (щоб двічі не підрахувати одну клітку) [35].

Розрахунки числа лейкоцитів проводять, виходячи з розведення крові (20), числа полічених квадратів (100) і обсягу одного великого квадрата за формулою [2.1]:

 (2.1)

де Х – кількість лейкоцитів в 1 л крові;

а – сума лейкоцитів у 100 великих квадратах;

b – розведення крові ( у 20 разів);

c – кількість підрахованих великих квадратів (100);

250 – перерахунок у мікролітри, тому що об'єм одного великого квадрата дорівнює 1/250 мкл;

106 – перерахунок із мікролітрів у літри.

2.2.4 Мікроскопія мазків крові. Складання лейкоцитарної формули.

Для приготування мазка крові на сухе знежирене предметне скло, ближче до короткого боку, наносять піпеткою невелику краплю крові. Предметне скло слід держати на столі або у лівій руці за вузькі краї. Правою рукою приставляють шліфоване скло вузьким краєм до скла з кров’ю зліва від краплі під кутом 450 та продвинути його вправо до з’єднання з краплею крові. Почекати до тих пір, поки кров розподілеться по всьому ребру шліфованого скла, а потім легким швидким рухом провести його зправа наліво до тих пір, поки не буде вичерпана вся крапля. Крапля крові повинна бути невеликою (5-10 мкл), щоб весь мазок поміщався на склі, не доходячи 1,0-1,5 см до його краю. Не можна сильно нажимати на скло, так як більшість клітин крові можуть бути ушкодженими. Добре зроблений мазок тонкий, має жовтуватий колір та закінчується «щіточкою».

Після приготування мазки слід швидко висушити на повітрі до зникнення вологого блиску. При повільному висушуванні може змінюватися морфологія клітин крові.

Після правильного приготування мазка крові й якісного забарвлення приступають до його вивчення. Огляд мазка починають з малого збільшення, при якому оцінюють якість мазка, але аналіз його проводять під імерсією. Слід мати на увазі, що не зважаючи на достатньо правильне технічне виконання мазка, клітини крові розподіляються не рівномірно по всьому препарату. Тому для отримання достовірних даних при підрахунку лейкоцитарної формули прийнято рахувати лейкоцити в різних ділянках мазка крові. Щоб уникнути повторного підрахунку одних і тих же лейкоцитів рекомендується рухатися по мазку крові зигзагами – лінією Меандра. Прийнято рахувати 200 лейкоцитів, відступаючи 0,3-0,5 см від основи "вусиків", рухаючись зигзагами на всю ширину мазка через 2-3 поля зору. Необхідно прагнути набрати дану кількість клітин на 1/2 мазка, де клітини розподілені найбільш оптимально без накладень. Різні види лейкоцитів, що зустрічаються при аналізі препарату, заносять в таблицю або враховують за допомогою спеціалізованого десятиклавішного лейкоцитарного лічильника. Після закінчення перегляду 200 лейкоцитів, визначають процентний вміст кожного з видів лейкоцитів. Це і є лейкоцитарна формула. Окрім процентного вмісту лейкоцитів велике значення має абсолютна кількість окремих видів лейкоцитів. Воно визначається з урахуванням загальної кількості лейкоцитів. Абсолютна кількість будь-якого виду лейкоцитів характеризує їх реальну участь в імунних реакціях. Відносну і абсолютну кількість лейкоцитів враховують у клінічній практиці. Особливо важливим для діагнозу і прогнозу є спостережувані зсуви в лейкоцитарній формулі.

Забарвлення препарату. При фарбуванні за Романовським-Гімза ядра клітин мають колір від темно-синього до фіолетового, цитоплазма зрілих гранулоцитів забарвлюється у рожевий колір, а цитоплазма лімфоцитів, моноцитів і бластних клітин – у синій. Еритроцити забарвлюються в солом’яно-жовтий колір. Якщо еритроцити забарвлені в відтінки синього кольору, то препарат перефарбований і його треба повторно диференціювати в підкисляючому середовищі. Якщо еритроцити забарвлені в червоний або оранжевий колір, значить фарба роз’їдена кислою дистильованою водою.

2.2.5 Метод підрахунку кількості еритроцитів

Камеру Горяєва накривають покривним скельцем і притирають його до появи райдужних кілець. Камеру розташовують під мікроскопом і розглядають при малому збільшенні, а потім при великому (до отримання чіткого зображення сітки Горєва).

Кров набирають в меланжер до мітки 0,5, протирають його кінчик фільтрувальним папером, потім до заповнюють розчином (3% NaCl) до мітки 101 (досягається розбавлення – в 200 разів). Обережно протягом хвилини змішують кров, затиснувши капіляр першим і третім пальцями. Видувають із змішувача на ватку 3 краплі, а 4-ту наносять на середню площадку камери біля краю покривного скельця. Капілярними силами крапля втягується під покривне скельце і заповнює камеру. Після заповнення камери вичікують 1-2хв (доки осядуть формені елементи) і починають підрахунок при малому збільшенні мікроскопа. Підрахунок еритроцитів ведуть при об'єктиві \*8 і окулярі \*15.

Підраховують кількість еритроцитів в 5 великих квадратах камери Горяєва (кожний з яких розділений на 16 маленьких), які розташовані в різних місцях сітки (наприклад, по діагоналі). При цьому доцільно користуватись правилом: «До даного квадрата відносяться всі еритроцити, які розташовані в середині та на верхній і лівій його межі» [37,38]

Розраховують вміст еритроцитів у 1 мкл крові за формулою [2.2]:

(2.2)

Де х – число еритроцитів в 1 мкл цільної крові;

n – сума еритроцитів в 80 маленьких квадратах;

200 –ступінь розведення крові;

4000 мм3  –об’єм 1 маленького квадрата

80 –кількість підрахованих маленьких квадратів

2.2.6 Розрахунок абсолютної кількості окремих видів лейкоцитів

Абсолютна кількість лейкоцитів – це кількість окремих видів лейкоцитів в 1 л крові. Для розрахунку абсолютної кількості потрібно знати: кількість кожного виду лейкоцитів у відсотках та загальну кількість лейкоцитів в 1 л крові.

Приклад розрахунку. Загальна кількість лейкоцитів –5·109/л; кількість еозинофілів, отримана під час підрахунку лейкоцитарної формули – 4%.

Розраховують абсолютну кількість еозинофілів за допомогою пропорції:

4% еозинофілів – 100 лейкоцитів; х еозинофілів в 1 л крові - 5·109/л лейкоцитів за формулою [2.3]:

 (2.3)

2.2.7 Дослідження гострої токсичності

Відомо, що реакція організму на інорідні речовини залежить від їх хімічної структури. В результаті проведення експериментальних досліджень вивчено залежність гострої токсичності похідних хіноліну від присутності в їх молекулах тих чи інших функціональних груп.

Вивчення гострої токсичності та загальної дії вивчаємих сполук визначали на інтактних безпородних мишах обох родів вагою 16-24 г [7].

Речовини вводили внутрішньочеревинно у вигляді тонкої водної суспензії, яку стабілізували твіном 80, або у вигляді розчину (розчинні у воді речовини) в об,ємі не більше 2 мл. Контрольній групі тварин вводили фізіологічний розчин і твін 80 в тому ж об`ємі, що й досліджуваним групам. Кожна група складалась з 5 тварин. Спостерігання за тваринами проводили протягом 10 діб після однократного введення вивчаємих сполук. Протягом всього часу спостерігання звертали увагу на поведінкові реакції, нервову, м’язову збудженість; контролювалась зміна маси тіла, характер виділення та продовження життя. Кількість тварин, що вижили або загинули, констатували через кожні 24 години. Середньосмертельні за методом дози (ЛД50) визначали за методом Кербера [40].

2.2.8 Дослідження антиоксидантної активності

Супероксид-радикал. В кювету 10 мм спектрофотометру СФ-46 вносять 2 мл 0,15 М натрій-карбонатного буферу з доданням  мл ЕДТА (рН 10,2), після цього додають розчини препаратів, що досліджуються. Реакцію починають, додаючи 0,4 мл  М водного розчину адреналіну. Кристалічний адреналін розчиняють в дистильованій воді і доводять розбавленою хлороводневою кислотою до рН 2,25. Спочатку визначають показник екстинції (Е1), що відображає швидкість неінгібованого аутоокислення адреналіну, а після цього показник екстинції (Е2), що відображає швидкість аутоокислення адреналіну в присутності досліджуваних препаратів. Реакцію проводять при температурі 35-360С на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 480 нм, час експозиції 3 хвилини.

Антиокислювальну активність препаратів, що досліджуються висловлюють в відсотках

Інгібування аутоокислення адреналіну і вираховують по формулі [2.4]:

 (2.4)

де Е1 – швидкість неінгібованого аутоокислення адреналіну;

Е2 – швидкість аутоокислення адреналіну в присутності препаратів, що досліджуються.

2.3 Статистична обробка експериментальних даних

Статистичну обробку результатів проводили шляхом обчислення середнього арифметичного значення, похибки середнього арифметичного, середнього квадратичного відхилення, достовірність різниці .

При порівнянні більше як двох незалежних вибірок використовували однофакторний дисперсний аналіз (One-Way ANOVA) за допомогою комп'ютерної програми SPSS [12].

Основним показником, що характеризує сукупність за величиною ознаки, яка вивчається, є середнє арифметичне значення, що визначали за формулою [2.5]:

 (2.5)

Далі підраховували відхилення кожного з отриманих результатів від середньої арифметичної , , після чого розраховували середнє квадратичне відхилення за формулою [2.6]:

 (2.6)

Потім знаходили величину похибки середнього значення (), яка прямо пропорційна середньому квадратичному відхиленню та обернено пропорційна числу проведених досліджень, за формулою [2.7]:

 (2.7)

Достовірність різницi визначали за формулами [2.8 та 2.9]:

 (2.8)

 (2.9)

Показник вірогідності (Р) визначали за таблицею Ст’юдента на підставі даних (td) [12].

3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Результати порівняння кількості лейкоцитів та еритроцитів

Експериментальні результати згідно мети і завдань представлені в таблиці 3.1 та 3.2.

Порівняльні данні по кількості лейкоцитів з витікаючій крові ранки щура та відцідженної крові з ШКТ МП. В динаміці двох гірудопунктур представлено в таблиці 3.1 та 3.2.

Таблиця 3.1 – Порівняльний аналіз кількості лейкоцитів з витікаючої крові ранки щура та відціжуваній з шлункового тракту щура після гірудопунктури

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| №  п.п | Кров з ранки щура | | Кров з ШКТ мп | |
| Гірудопунктура | | Гірудопунктура | |
| 1 приставка | 2 приставка | 1 приставка | 2 приставка |
| 1. | 10,4 | 12,9 | 15,75 | 23,40 |
| 2. | 4,5 | 5,6 | 7,5 | 10 |
| 3. | 7,45 | 9,25 | 11,6 | 16,70 |
| 4. | 12,20 | 15,60 | 17,75 | 25,30 |
| 5. | 10,50 | 13,10 | 16 | 23,05 |
| 6. | 5,10 | 6,55 | 8,30 | 12,15 |
| 7. | 7,70 | 9,65 | 11,90 | 16,70 |
| 8. | 11,25 | 14,60 | 16,75 | 24,30 |
| 9. | 9,30 | 11,90 | 14,75 | 22,30 |
| 10. | 4,90 | 6,45 | 7,80 | 10,75 |
| Всього | 8,33± | 10,56± | 12,81± | 18,46± |
| Mx | 0,79 | 0,92 | 1,11 | 1,82 |

Таблиця 3.2 ‒ Порівняльний аналіз кількості еритроцитів з витікаючої крові ранки щура та відціжуваній з шлункового тракту щура після гірудопунктури

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| №  п.п. | Кров з ранки щура | | Кров з ШКТ мп | |
| Гірудопунктура | | Гірудопунктура | |
| 1 приставка | 2 приставка | 1 приставка | 2 приставка |
| 1 | 5,30 | 6,31 | 7,20 | 9,60 |
| 2 | 3,90 | 6,20 | 3,50 | 1,10 |
| 3 | 4,25 | 5,22 | 5,35 | 10,30 |
| 4 | 6,30 | 5,44 | 8,40 | 10,50 |
| 5 | 5,35 | 6,33 | 7,22 | 8,60 |
| 6 | 3,24 | 6,18 | 3,55 | 11,20 |
| 7 | 4,15 | 4,75 | 5,41 | 9,92 |
| 8 | 5,90 | 4,52 | 8,04 | 9,84 |
| 9 | 5,36 | 5,46 | 7,18 | 8,52 |
| 10 | 3,18 | 5,84 | 4,02 | 11,80 |
| Всього | 4,69±0,12 | 5,62±0,14 | 5,98±0,15 | 9,13±0,12 |
| Mx | 0,36 | 0,40 | 0,45 | 0,55 |

Аналіз таблиці 3.3 показав що кількість лейкоцитів капілярної крові відтікаючої з ранки при першій постановці коливався від 4,5 Гл до 12,20 Гл та в середньому становив 8,33±1,11 Гл (t 3,29; p <0,05), таблиця 3.3.

Феномен збільшення кількості лейкоцитів в той час відцідженої крові щура з ШКТ п’явки можна пояснити біологією її харчування, яка еволюціювала в процесі філогенезу між п’явкою та хазяїном, п’явка в процесі харчування на ссавцях (потіє) тобто виділяє вологу через слизистий епідерміс.

Ця рідина абсорбується в ШКТ з з´їденої крові, в результаті розчинні органічні речовини в плазмі крові та форменні елементи концентруються тим самим збільшується кількість пластичних речовин в одиниці об’єму шлунку МП, за данними літератури, процес концентрації пластичних речовин з з’їденої крові в ШКТ п’явки продовжується і на слідуючу добу. Концентрація пластичних речовин для трофічних цілей МП окрім того вирішує і іншу задачу – пригнічення високо-імунних властивостей крові ссавців щоб вони (імунні фактори) не пошкодили мікрофлору ШКТ яке для крові ссавця є чужорідним. В результаті мігби виникнути ефект типу «реакція трансплантанту проти хазяїна». В якості хазяїна в данній системі виступає ШКТ МП, а в якості трансплантанту кров ссавця.

Після другої ГП через тиждень після першої, кількість лейкоцитів витікаючої крові з ранки щура мала тенденцію до збільшення та коливалась в межах від 5,6 Гл до 15,6 Гл в окремих щурів в середньому кількість лейкоцитів витікаючої крові з ранки щура складало 10,56±0,92 Гл.

Проте ця тенденція до збільшення кількості витікаючої крові з ранки не досягла достовірного рівня про що свідчить статистичні показникики ( t=1,85; p>0,05) табл.3.3.

Тенденція до збільшення кількості лейкоцитів в витікаючій крові з ранки щура після другої ГП може бути пояснена декількома механізмами:

По перше, в зоні приставки МП в міжлопаттеву область щура після першої герудопунктури відбулися видозміни в тканинах, за рахунок біологічних властивостей компонентів слюни в данній області регенераційні процеси в тканинах, відбулося покращення кровопостачання даної області за рахунок розширення та новоутворення кровоносних та лімфатичних капілярів

По друге, вірогідно, відбулась перебудова популяцій лейкоцитів крові, що можливо буде з´ясувати по формулі крові.

При порівнянні кількості лейкоцитів з відтікаючій крові ранки щура та відціженної її з ШКТ МП знайденні суттєві відмінності. В ШКТ МП після другої ГП, кількість лейкоцитів коливалось ще в більших межах від 10,00 Гл до 25,30 Гл, що в середньому становило 18,46 ± 1,82 (t=3,89; p<0,01) табл. 3.3

Вже нами описано вище, що при порівнянні першої ГП даний механізм залишається в силі і після другої ГП. При цьому представлено інтерес зміни співвідношення популяцій лейкоцитів в шлунковій крові в порівнянні з кров’ю відтікаючої з ранки. Ці досліди заплановані при слідуючих експериментальних дослідах.

Порівняльний аналіз кількості лейкоцитів ШКТ при першій та другій постановці, також виявили значну відмінність. При першій постановці кількості лейкоцитів з відціженої крові ШКТ мп 18,46 (t=2,65; p<0,05) табл.3.3. Достовірне збільшення кількості лейкоцитів в відціженній крові з ШКТ МП після дрогої пристановки є реалізацією тенденцій до збільшення лейкоцитів в відтікаючій крові з ранки щура після двух ГП 10,56 ±0,92 в порівнянні з кількість лейкоцитів в відтікаючій крові з ранки щура після першой ГП 8,33± 0,79 ( t=3,29 ; p<0,05).

Нами виявленно певна зміна та особливості динаміки кількості еритроцитів крові яка витікає з ранки щура та відцідженої з ШКТ в динаміці ГП, кількість еритроцитів крові з ранки щура після першої ГП коливалось в досить вузьких межах від 3,18 Гл до 6,30 Гл млн/мкл³ та в середньому складало 4,69±0,36 млн/мкл³. З відціженої крові шлунка п’явки кількість еритроцитів мало тенденцію до збільшення з індивідуальними коливаннями від 3,50 до 8,40 млн/мкл³ та в середньому становило 5,98±0,75 ця тенденція не досягала достовірних відмінностей в крові з ранки щура (t=1,75; p>0,05).

Причина тенденції до збільшення кількості еритроцитів в шлунку крові також можливо пояснити її згущенням за рахунок транссудації рідкої частини плазми на поверхню п’явки в процесі годування. Проте причина недосягнення цих відмінностей в шлунку крові в порівнянні з достовірними відмінками лейкоцитів після першої ГП можливо пояснити слідуючим. Резистентність еритроцитів щура до мікрооточення ШКТ п’явки та її біологічно активними речовинами значно нижче в порівнянні з лейкоцитами, а значна їх частина встигала гемолізуватися протягом акту годування (близько години). Дане припущення підтверджує забарвлення плазми шлункової крові в рожевий колір за рахунок гемолізу еритроцитів. Після другого ГВ кількість еритроцитів в крові щура, відцідженої з шлунку МП достовірно збільшилась до (9,13±0,55) в порівнянні з їх кількістю з витікаючої крові ранки щура (4,45±0,40). Збільшення кількості еритроцитів шлункової крові при двух ГП, з´явилось збільшення кровопостачання грудної області щура після першої ГП.

Даний висновок ґрунтується на порівнянні кількості еритроцитів витікаючої крові з ранки після першої (4,69±0,35 млн/мкл³) та другої (5,62±0,40 млн/мкл³) ГП, яка мала тенденцію до збільшення але не досягала достовірного рівня (t=1,70 ; p>0,05) табл. 3.3. Останнє пояснення збільшення кількості еритроцитів в шлунку МП після другої ГП підтверджувало порівняльний аналіз відцідженої крові після першої та другої ГП 5,98±0,45 та 9,13±0,55 відповідно з високою достовірністю при (t=3,42; p<0,05).

Таблиця 3.3 ‒ Критерії Ст´юдента (t) порівняльний аналіз кількості лейкоцитів та еритроцитів з виділеної крові з ранки щура та відцідженої крові з ШКТ мп

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Показник | Порівняльні показники | t | p |
| Л | Ранка щура + ШКТ мп 1 постановка ГП | 3,29 | <0,05 |
| Ранка щура + ШКТ мп 2 постановка ГП | 3,89 | <0,01 |
| Ранка щура 1 ГП та 2 ГП | 1,85 | >0,05 |
| ШКТ мп 1 ГП та 2 ГП | 2,65 | <0,05 |
| Е | Ранка щура + ШКТ мп 1 постановка ГП | 1,57 | >0,05 |
| Ранка щура + ШКТ мп 2 постановка ГП | 5,16 | <0,01 |
| Ранка щура 1 ГП та 2 ГП | 1,70 | >0,05 |
| ШКТ мп 1 ГП та 2 ГП | 3,42 | <0,05 |

3.2 Структура синтезованих речовин



Рисунок 3.1 – Сполука 1. 2-Метил-6-бром-4-S-хінолін



Рисунок 3.2 – Сполука 2. 2-Метил-6-бром-4-S-хінолін оцтова кислота



Рисунок 3.3 – Сполука 3. Етиловий ефір 2-метил-6-бром-4-S-хінолін-оцтової кислоти



Рисунок 3.4 – Сполука 4. Гідразид 2-метил-6-бром-4-S-хінолін-оцтової кислоти



Рисунок 3.5 – Сполука 5. Амід 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти



Рисунок 3.6 – Сполука 6. Анілід 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти



Рисунок 3.7 – Сполука 7. Пара-диметиламін-бензиліден-гідразид 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти



Рисунок 3.8 – Сполука 8. Натрієва сіль 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти

3.3 Прогноз біологічної дій сполук, які вивчаються

Прогноз біологічної активності проводився для бромпохідних хіноліну. При проведені прогнозу програмі PASS була задана імовірність Ра>0,4 з метою отримання більш імовірних результатів.

При використанні програми біологічного прогнозу PASS були отримані наступні дані, які подано у табл. 3.4-3.11.

Отриманні результати свідчать про те, що сполука 1 володіє високим рівнем антиоксидантної, діуретичної дії, приймає активну участь у регуляції проникливості іонних каналів та блокує рецептори для глутамата, який є найважливішим медіатором в головному мозку. Крім того дана сполука проявляє протизапальну дію (антагоніст інтерлейкінів) та за даними прогнозу їй не властиві токсичні ефекти.

Таблиця 3.4 – Біологічна дія сполуки 1

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Nп/п | Pa | Pi | Вид активності |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 0,971 | 0,003 | Антиоксидантна |
| 2 | 0,877 | 0,002 | Антагоніст гліцинової ділянки рецептора NMDA |
| 3 | 0,779 | 0,007 | Діуретична |
| 4 | 0,753 | 0,004 | Антагоніст NMDA рецептора |
| 5 | 0,639 | 0,005 | Антагоніст рецептора глутамінової кислоти |
| 6 | 0,632 | 0,008 | Лікування ниркових захворювань |
| 7 | 0,628 | 0,029 | Збільшення ЛПВП |
| 8 | 0,599 | 0,015 | Лікування неврологічних розладів |
| 9 | 0,602 | 0,024 | Антагоніст інтерлейкінів |
| 10 | 0,589 | 0,014 | Антисептична |
| 11 | 0,596 | 0,097 | Аритмогенік |
| 12 | 0,546 | 0,054 | Лікування атеросклерозу |
| 13 | 0,501 | 0,026 | Інгібітор циклази 2,3-оксисквален-ланостерол |
| 14 | 0,496 | 0,050 | Судиннорозширювальний засіб, коронарна |
| 15 | 0,456 | 0,015 | Антагоніст аденозинового рецептора А3 |
| 16 | 0,479 | 0,044 | Противірусна (грип) |
| 17 | 0,479 | 0,046 | Антиневрогенний біль |
| 18 | 0,476 | 0,058 | Спермацидна |
| 19 | 0,411 | 0,007 | Антиуремічна |
| 20 | 0,439 | 0,092 | Антитоксинна |

Ми бачимо, що імовірність (Pa) прогнозу для деяких видів біологічної дії більша ніж Ра> 0,7,що свідчить про те, що дана сполука може бути аналогом лікарського засобу, який вже використовується у практиці. Сполука 2 має більший спектр біологічної дії ніж сполука 1. Це може бути пояснено тим, що сполука 2 є кислотою та має високий коефіцієнт ліпофільності. З отриманого прогнозу ми бачимо наявність антиоксидантної та діуретичної дії, також з’являється біологічна дія, яка сприяє нормалізації порушень психосексуальної функції. Дана сполука проявляє протизапальну дію, противиразкову дію та володіє противірусним ефектом. Слід відзначити, що прояв цих дій може бути отриманий в експерименті, тому як імовірність прогнозу для цих видів активності 0,5<Ра <0,7.

Таблиця 3.5 – Біологічна дія сполуки 2

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nп/п | | Pa | | Pi | | Вид активності | |
| 1 | | 2 | | 3 | | 4 | |
| 1 | | 0,727 | | 0,008 | | Антиоксидантна | |
| 2 | | 0,720 | | 0,023 | | Лікування розладів психосексуальної функції | |
| 3 | | 0,595 | | 0,039 | | Збільшення ЛПВП | |
| 4 | | 0,574 | | 0,018 | | Інгібітор циклази 2,3-оксисквален-ланостерол | |
| 5 | | 0,583 | | 0,042 | | Лікування атеросклерозу | |
| 6 | | 0,549 | | 0,015 | | Діуретична | |
| 7 | | 0,522 | | 0,007 | | Антихелікобактерна | |
| 8 | | 0,508 | | 0,011 | | Тромболітична | |
| 9 | | 0,512 | | 0,033 | | Антиневрогенний біль | |
| 10 | | 0,481 | | 0,030 | | Антивиразкова | |
| 11 | | 0,447 | | 0,007 | | Антогоніст лейкотрієна Е4 | |
| 12 | | 0,449 | | 0,009 | | Інгібітор синтезу лейкотрієнів | |
| 13 | | 0,448 | | 0,014 | | Антидіабетична | |
| 14 | | 0,439 | | 0,028 | | Інгібітор 5 ліпооксигенази | |
| 15 | | 0,433 | | 0,022 | | Антагоніст аденозинового рецептора А3 | |
| 16 | | 0,471 | | 0,065 | | Спермацидна | |
| 17 | | 0,483 | | 0,084 | | Антиастматична | |
| 18 | | 0,469 | | 0,086 | | Антагоніст інтерлейкінів | |
| 19 | | 0,431 | | 0,056 | | Антиалергічна | |
| 20 | | 0,512 | | 0,140 | | Аритмогенік | |
| 21 | | 0,441 | | 0,069 | | Противірусна (грип) | |

Сполука 3 на першому місці у таблиці прогнозу має біологічну дію, яка нормалізує порушення психосексуальної функції, причому тільки ця дія може проявитися як потенційна лікарська дія. Інші види активності можуть бути визначені в ході експериментів, але 100% гарантії їх наявності ми не маємо т. як імовірність прояву Ра=0,5 та Ра<0,5.

Таблиця 3.6 – Біологічна дія сполуки 3

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Nп/п | Pa | Pi | Вид активності |
| 1 | 0,718 | 0,024 | Лікування розладів психосексуальної функції |
| 2 | 0,652 | 0,077 | Аритмогенік |
| 3 | 0,544 | 0,007 | Антихелікобактерна |
| 4 | 0,576 | 0,044 | Лікування атеросклерозу |
| 5 | 0,549 | 0,019 | Антиоксидантна |
| 6 | 0,539 | 0,02 | Акарицид |
| 7 | 0,533 | 0,021 | Противиразкова |
| 8 | 0,495 | 0,037 | Спермацидна |
| 9 | 0,464 | 0,014 | Антагоніст аденозинового рецептора А3 |
| 10 | 0,439 | 0,031 | Діуретична |
| 11 | 0,483 | 0,077 | Антагоніст інтерлейкінів |
| 12 | 0,488 | 0,082 | Протиастматична |
| 13 | 0,500 | 0,095 | Збільшення ЛПВП |
| 14 | 0,430 | 0,03 | Тромболітична |
| 15 | 0,429 | 0,036 | Інгібітор циклази 2,3-оксисквален-ланостерол |
| 16 | 0,451 | 0,062 | Антиневрогенний біль |

Сполука 5 проявляє свої види біологічної дії як ті, що впливають на процеси, які мають місце в нервовій системі (табл. 3.7).

Крім того імовірність цього Ра>0,7, що свідчить про можливості отримання лікарського засобу. Також ми бачимо наявність антиоксидантної та антихелікобактеріальної дії.

Таблиця 3.7 - Біологічна дія сполуки 5

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Nп/п | Pa | Pi | Вид активності |
|  | 0,714 | 0,007 | Антагоніст альфа 1 адренорецепторів |
| 2 | 0,707 | 0,026 | Лікування розладів психосексуальної функції |
| 3 | 0,579 | 0,007 | Антихелікобактеріальна дія |
| 4 | 0,570 | 0,017 | Антиоксидантна |
| 5 | 0,541 | 0,041 | Психостимулянт |
| 6 | 0,523 | 0,077 | Збільшення ЛПВП |
| 7 | 0,471 | 0,026 | Диуретична |
| 8 | 0,485 | 0,076 | Антагоніст інтерлейкінів |
| 9 | 0,430 | 0,022 | Антагоніст аденозинового рецептора А3 |
| 10 | 0,453 | 0,060 | Антиневрогенний біль |
| 11 | 0,430 | 0,045 | Противиразкова |
| 12 | 0,416 | 0,038 | Інгібітор циклази 2,3-оксисквален-ланостерол |
| 13 | 0,442 | 0,068 | Противірусна (грип) |
| 14 | 0,428 | 0,133 | Спермацидна |

За даними прогнозу біологічна дія сполуки 6, яка може бути проявлена в експерименті це збільшення рівня ЛПВП. Можна зробити висновок, що введення бензольного кільця до молекули хіноліну значно зменшує спектр біологічної дії.

Таблиця 3.8 – Біологічна дія сполуки 6

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Nп/п | Pa | Pi | Вид активності |
| 1 | 0,572 | 0,047 | Збільшення ЛПВП |
| 2 | 0,491 | 0,038 | Противірусна (грипп) |
| 3 | 0,483 | 0,049 | Спермацидна |
| 4 | 0,460 | 0,070 | Офтальмологічні ліки |
| 5 | 0,407 | 0,025 | Протитуберкульозна |
| 6 | 0,428 | 0,048 | Інгібітор лейкопоеза |
| 7 | 0,466 | 0,089 | Антагоніст інтерлейкінів |
| 8 | 0,430 | 0,070 | Акарицидна |
| 9 | 0,494 | 0,154 | Антацидна |
| 10 | 0,435 | 0,104 | Ліпотропна |

Сполука 7 може проявити в експерименті ті види активності, як і попередні сполуки, що підтверджує структурну важливість гідразинового та бензольного фрагментів в молекулі хіноліну.

Таблиця 3.9 - Біологічна дія сполуки 7

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Nп/п | Pa | Pi | Вид активності |
| 1 | 0,636 | 0,007 | Антимікобактеріальна |
| 2 | 0,627 | 0,007 | Протитуберкульозна |
| 3 | 0,526 | 0,025 | Противірусна (грипп) |
| 4 | 0,468 | 0,012 | Інгібітор МАО |
| 5 | 0,414 | 0,021 | Інгібітор алкогольдегідрогенази |
| 6 | 0,430 | 0,045 | Інгібітор лейкопоеза |
| 7 | 0,457 | 0,101 | Інгібітор АТФази |

Сполука 8 представляє собою натрієву сіль 2-метил-6-бром-4-тіооцтової кислоти хіноліну. Ця сполука може проявляти схожі види біологічної дії як і кислота. Слід відзначити, що після гідролізу, який має місце в шлунку, натрієва сіль перетворюється в кислоту та потрапляє в кров.

Таблиця 3.10 – Біологічна дія сполуки 8

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Nп/п | Pa | Pi | Вид активності |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | 0,745 | 0,020 | Лікування розладів психосексуальної функції |
| 2 | 0,638 | 0,013 | Антиоксидантна |
| 3 | 0,635 | 0,028 | Збільшення ЛПВП |
| 4 | 0,616 | 0,015 | Інгібітор циклази 2,3-оксисквален-ланостерол |
| 5 | 0,644 | 0,079 | Аритмогенік |
| 6 | 0,565 | 0,007 | Антихелікобактеріальна дія |
| 7 | 0,556 | 0,015 | Лікування розладів печінки |
| 8 | 0,554 | 0,016 | Гепатопротекторна |
| 9 | 0,550 | 0,015 | Діуретична |
| 10 | 0,533 | 0,060 | Лікування атеросклерозу |
| 11 | 0,504 | 0,036 | Антиневрогенний біль |
| 12 | 0,483 | 0,029 | Антиульцеративна |
| 13 | 0,475 | 0,025 | Антисептична |
| 14 | 0,509 | 0,061 | Антагоніст інтерлейкінів |
| 15 | 0,460 | 0,015 | Антагоніст аденозинового рецептора А3 |
| 16 | 0,480 | 0,053 | Спермацидна |
| 17 | 0,465 | 0,052 | Протигрипозна |
| 18 | 0,425 | 0,020 | Антиоксидантна |

Продовження таблиці 3.10

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| 19 | 0,432 | 0,029 | Тромболітична |
| 20 | 0,410 | 0,013 | Інгібітор синтезу лейкотрієнів |

3.3 Результати досліджень гострої токсичності

Сполуки були перевірені на гостру токсичність. Результати визначення гострої токсичності похідних 2-метил-6-бромхінолінів надані в таблиці 3.11.

Як показали дослідження, синтезовані сполуки належать до токсичних речовин. Так, у 2-метил-6-бром-4-S-хінолін (сполука 1) гостра токсичність була 98 ± 5,6 мг/кг.

Введення залишку оцтової кислоти призводить до підвищення гострої токсичності до 65 ± 4,1 мг/кг (сполука 2), а амідування 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти (сполука 5) – до зниження гострої токсичності, яка проте не досягає рівня 2-метил-6-бром-4-S-хіноліну.

Найменш токсичними виявились анілід 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти (сполука 6) та пара-диметиламін-бензиліден-гідразид 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти (сполука 7).

Можна припустити, що висока ліпофільність цих сполук та відомі фармакофори – бром в шостому положенні та меркаптогрупа – приводять до наявності значної біологічної дії, що виражається в їх токсичності.

Таблиця 3.11 – Гостра токсичність похідних 2-метил-6-бромхінолінів

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| N п/п | Назва сполуки | Токсичність,  мг/кг |
| 1 | 2-метил-6-бром-4-S-хінолін | 98±5,6 |
| 2 | 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти | 65±4,1 |
| 5 | Амід 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової  Кислоти | 83±4,8 |
| 6 | Анілід 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти | 105±5,1 |
| 7 | Пара-диметиламін-бензиліден-гідразид 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти | 125±5,5 |

3.4 Антиоксидантна активність похідних 2-метил-6-бромхінолінів

Для експериментального підтвердження прогнозу антиоксидантної активності були вибрані сполуки з Рa > 0,5. Це амід 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти, 2-метил-6-бром-4-S-хінолін та 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтова кислота.

Дослідження антиоксидантної активності 4-S-похідних хіноліну проводили на моделі ініціації вільнорадикального окислення, а саме інгібування супероксидрадикалу. Також було проведено порівняння антиоксидантної дії вивчаємих сполук з відомими антиоксидантами (сечовина та цистеїн). Отримані дані подані в таблиці 3.12.

Отриманні дані свідчать про те, що сполуки, які вивчаються, мають антиоксидантну дію на моделі ініціювання вільнорадикального окислення, що в свою чергу підтверджує дані комп’ютерного прогнозу. Найбільшу антиоксидантну дію проявляє 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти.

У нього антиоксидантна активність знаходилася на рівні речовин порівняння – перевищувала активність L-цистеїну, але не досягала активності сечовини. Сам 2-метил-6-бром-4-S-хінолін мав дещо меншу антиоксиданту активність, яка складала 21 %. Найменшу дію проявив амід 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти. Таким чином, 2-метил-6-бром-4-S-хінолін та його оцтова кислота мають перспективність в плані створення антиоксидантних засобів.

Таблиця 3.12 – Результати дослідження антиоксидантної активності

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Сполука | Інгібіювання супероксидрадикалу | |
| Оптична густина | АОА, % |
| 1 | 2 | 3 |
| І | 0,168±0,002 | 21 |
| ІІ | 0,14±0,002 | 33 |
| V | 0,19±0,0114 | 14 |
| L-цистеїн | 0,16 ± 0,002 | 26,19 |
| Сечовина | 0,13 ± 0,004 | 38,1 |

3.5 Результати експериментального підтвердження комп’ютерного прогнозу

Шляхом порівняння всіх даних, які були отримані експериментальним шляхом, з даними комп’ютерного прогнозу системи PASS та GUSAR online можна зробити деякі висновки з приводу точності комп’ютерних даних. Результати порівняння подані в таблицях 3.15 і 3.16. З таблиці 3.13 видно, що у всіх випадках данні комп’ютерного прогнозу підтверджуються. Тобто, якщо ймовірність прояву того чи іншого виду дії становить Ра > 0,5 за результатами прогнозу, то наявність цього виду дії підтвердилась для всіх хімічних сполук. При ймовірності прояву біологічної дії Ра < 0,5, експериментального підтвердження цього виду біологічної дії для цих сполук не спостерігається.

З таблиці 3.14 видно, що майже у половини випадків данні комп’ютерного прогнозу підтверджуються. Майже у половини досліджених сполук під час експериментального дослідження клас токсичності змістився на порядок в бік її збільшення. У іншої ж частини дані прогнозу експериментально підтвердилися

Таблиця 3.13 - Експериментальне підтвердження даних комп’ютерного прогнозу біологічної активності

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Номер сполуки | Вид активності | Імовірність прояву | Результат в експерименті |
| 1 | Антиоксидантна | 0,971 | Властива |
| 2 | Антиоксидантна | 0,727 | Властива |
| 5 | Антиоксидантна | 0,570 | Властива |

Таблиця 3.14 – Експериментальне підтвердження даних комп’ютерного прогнозу гострої токсичності

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Номер сполуки | Прогноз | Клас токсичності | Ступінь токсичності | Результат в експерименті | Клас токсичності | Ступінь токсичності |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 1 | 349,200 | IV | Малотоксичні | 98±5,6 | III | Помірно  токсичні |
| 2 | 505,800 | IV | Малотоксичні | 65±4,1 | III | Помірно  токсичні |

Продовження таблиці 3.14

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 5 | 867,400 | IV | Малотоксичні | 83±4,8 | III | Помірно  токсичні |
| 6 | 875,300 | IV | Малотоксичні | 105±5,1 | IV | Малотоксичні |
| 8 | 1204,000 | V | Практично нетоксичні | 125±5,5 | IV | Малотоксичні |

3.6 Динаміка відносної кількості лейкоцитів крові щурів у хронічному експерименті при уведенні 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти

Результати динаміки загальної кількості лейкоцитів в периферичній крові та окремих морфологічних форм у крові щурів представлені у табл. 3.15, додатках А-Б.

Як показали результати досліджень, кількість лейкоцитів у крові щурів через дві доби не змінилася, а через 7 діб відбувалося їх недостовірне зниження. Що стосується лейкограми, то достовірно зменшувалась кількість ПЯН відносно контролю (Р < 0,01) і поступово недостовірно СЯН.

Навпаки, кількість еозинофілів та мононуклеарів зростала на другу добу.

Причому достовірне зростання відбувалося тільки для лімфоцитів. На сьому добу достовірно зменшувалася до рівня контролю кількість лімфоцитів та ставала нижчою за контроль кількість моноцитів.

Таблиця 3.15 – Динаміка кількості лейкоцитів у крові щурів у хронічному експерименті при уведенні 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Місце  проживання | Триместр дослідження | Середнє  значення | Стандартне відхилення | | Стандартна  похибка | | Довірчий інтервал | | Мінімальне  Значення | Максимальне значення | |
| Нижня межа | Верхня межа |
| Лейкоцити,  109/л | 1 | 15,00 | 1,000 | | 0,577 | | 12,52 | 17,48 | 12 | 17,67 | |
| 2 | 15,30 | 1,483 | | 0,663 | | 13,46 | 17,14 | 13,3 | 17,45 | |
| 3 | 13,40 | 1,673 | | 0,748 | | 11,32 | 15,48 | 11 | 16 | |
| Еозинофіли % | 1 | 0 | 0 | | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 2 | 0,40 | 0,548 | | 0,245 | | -0,28 | 1,08 | 0 | 1,10 | |
| 3 | 0,40 | 0,548 | | 0,245 | | -0,28 | 1,08 | 0 | 1,10 | |
| ПЯН, % | 1 | 0,67 | 0,58 | 0,33 | | -0,77 | | 2,10 | 0 | | 2,19 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | | 0 | | 0 | 0 | | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | | 0 | | 0 | 0 | | 0 |
| ПЯН, % | 1 | 21,3 | 1,3 | 0,75 | | 18,07 | | 24,52 | 18 | | 25,0 |
| 2 | 18,0 | 6,32 | 2,83 | | 10,15 | | 25,85 | 10,0 | | 25,90 |
| 3 | 15,0 | 3,08 | 1,38 | | 11,17 | | 18,82 | 11,08 | | 20,0 |
| Моноцити, % | 1 | 5,0 | 1,0 | 0,58 | | 2,52 | | 7,48 | 2,49 | | 7,55 |
| 2 | 8,0 | 2,55 | 1,14 | | 4,83 | | 11,17 | 4,75 | | 12 |
| 3 | 3,5 | 1,414 | 0,63 | | 1,74 | | 5,26 | 1,65 | | 5,36 |
| Лімфоцити, % | 1 | 71,667 | 4,536 | 2,62 | | 60,39 | | 82,93 | 60,30 | | 79,9 |
| 2 | 80,000 | 1,224 | 0,55 | | 78,48 | | 81,52 | 78,3 | | 82,0 |
| 3 | 71,000 | 5,567 | 2,49 | | 64,08 | | 77,91 | 62,0 | | 78,0 |

Примітки: 1 – контроль (n=5);

2 – через 2 доби після уведення речовини;

3 – через 7 діб після уведення речовини

Множинні порівняння між показниками представлені у таблиці 3.16.

Таблиця 3.16 – Множинні порівняння

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Групи порівняння | Достовірність | | | | | |
| лейкоцити | еозинофіли | ПЯН | СЯН | моноцити | лімфоцити |
| 1-2 | Р > 0,05 | Р > 0,05 | Р < 0,01 | Р > 0,05 | Р > 0,05 | Р < 0,01 |
| 1-3 | Р > 0,05 | Р > 0,05 | Р < 0,01 | Р > 0,05 | Р > 0,05 | Р > 0,05 |
| 2-3 | Р > 0,05 | Р > 0,05 | Р > 0,05 | Р > 0,05 | Р < 0,01 | Р < 0,01 |

3.7 Динаміка абсолютної кількості лейкоцитів крові щурів у хронічному експерименті при уведенні 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти

Для того, щоб виключити діагностичну похибку при обстеженні тварини, дуже важливо визначити не тільки відсоткове відношення різних типів лейкоцитів, але й їх абсолютну кількість в крові. Показники абсолютної кількості лейкоцитів крові у щурів представлені у табл.3.17, додатках В-Д.

Як показали дослідження всі абсолютні показники лейкограми крові протягом 7 діб змінюються аналогічно. Лише абсолютна кількість моноцитів на відміну від відносної, де збільшення було не достовірним, на другу добу збільшується достовірно.

Таблиця 3.17 – Динаміка абсолютної кількості лейкоцитів у крові щурів при дослідженні хронічної токсичності при уведенні 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Місце проживання | Триместр дослідження | Середнє значення | Стандартне відхилення | Стандартна похибка | 95% довірчий інтервал для середнього | | Мінімальне значення | Максимальне значення |
| Нижня межа | Верхня межа |
| Еозинофіли % | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0,06 | 0,082 | 0,037 | -0,042 | 0,162 | 0 | 0,16 |
| 3 | 0,06 | 0,082 | 0,037 | -0,042 | 0,162 | 0 | 0,16 |
| ПЯН, % | 1 | 0,09 | 0,08 | 0,05 | -0,11 | 0,31 | 0 | 0,35 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| СЯН, % | 1 | 3,190 | 0,34 | 0,19 | 2,34 | 4,06 | 2,28 | 4,14 |
| 2 | 2,82 | 1,29 | 0,57 | 1,23 | 4,41 | 1,12 | 5,07 |
| 3 | 1,99 | 0,39 | 0,17 | 1,51 | 2,48 | 1,50 | 2,6 |
| Моноцити, % | 1 | 0,75 | 0,17 | 0,1 | 0,34 | 1,18 | 0,30 | 0,90 |
| 2 | 1,21 | 0,34 | 0,15 | 0,79 | 1,63 | 0,74 | 1,68 |
| 3 | 0,46 | 0,18 | 0,08 | 0,24 | 0,69 | 0,24 | 0,70 |
| Лімфоцити, % | 1 | 10,75 | 0,92 | 0,53 | 8,47 | 13,0 | 8,40 | 13,3 |
| 2 | 12,24 | 1,17 | 0,52 | 10,78 | 13,69 | 10,5 | 14,0 |
| 3 | 9,54 | 1,51 | 0,68 | 7,66 | 11,42 | 7,44 | 11,48 |

Множинні порівняння між показниками представлені у таблиці 3.18.

Таблиця 3.18 – Множинні порівняння

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Групи порівняння | Достовірність | | | | |
| еозинофіли | ПЯН | СЯН | моноцити | лімфоцити |
| 1-2 | Р > 0,05 | Р < 0,01 | Р > 0,05 | Р < 0,05 | Р < 0,01 |
| 1-3 | Р > 0,05 | Р < 0,01 | Р > 0,05 | Р > 0,05 | Р > 0,05 |
| 2-3 | Р > 0,05 | Р > 0,05 | Р > 0,05 | Р < 0,001 | Р < 0,01 |

Таким чином, дана речовина при тривалому уведенні здійснювала пригнічуючий ефект на показники лейко грами.

4 ОХОРОНА ПРАЦІ

Мета даного розділу показати практичні вміння застосовувати теоретичне знання при виконанні дипломної роботи на тему: «Біологічна активність природних та синтезованих біологічно активних речовин».

Перед початком роботи науковим керівником був проведений інструктаж з охорони праці за інструкціями № 296 та № 199 з Охорони праці та інструкцією № 62 з Пожежної безпеки.

В процесі виконання досліджень доводиться мати справу з біологічними речовинами, електроприладами і лабораторним посудом. Основні небезпечні виробничі пошкодження при виконанні роботи, які можуть статися: термічні і хімічні опіки, електротравми, попадання хімічних і біологічних рідин на одяг, шкіру і слизові оболонки. При роботі в лабораторії можуть виникати травми внаслідок невмілого і недбалого використання приладів та інструментів.

В лабораторії формується свій мікроклімат, який впливає на здоров’я людини. У робочій зоні повинні дотримуватися визначені параметри температури, вологості, освітлення, швидкості переміщення повітря [42]. Повітря робочої зони повинно відповідати ДСТу 12.1.005-88 [43]. Важливу роль має відновлення концентрації кисню закритого приміщення, зниження концентрації вуглекислого газу, залишків хімічних речовин. Необхідно забезпечувати постійний рух повітря, шляхом відкриття вікон, приточно- витяжної вентиляції, що повинна відповідати СНІп 2.04.05-91 і ДНАОП 0.03-3.15-89 [43,44]. Температура повітря повинна бути в оптимальному діапазоні 18о-20оС. Оптимальна швидкість руху повітря у приміщенні – 0,25-0,3 м/с. Відносна вологість повітря 60-70%. Атмосферний тиск в лабораторії 760 мм.рт.ст [42,43]. Санітарні норми щодо вібрації та шуму дотримані згідно ДНАОП 0.03-3.12-84 та ДНАОП 0.03-3.14-85. Освітленість створюється сонцем і за допомогою ламп накалювання або люмінесцентних ламп і повинно відповідати вимогам ДБН В.2.5–28–2006 [44,45].

Безпека у лабораторіях повинна забезпечуватися відповідно до вимог ДНАОП 9.2.30–1.06–98 та інших діючих нормативних актів. На всі види робіт, що являють потенційну небезпеку повинна бути підготовлена документація, що узгоджується з керівником робіт. Для запобігання виникнення нещасних випадків, пожеж і вибухів слід чітко виконувати правила з техніки безпеки. Експерименти треба проводити акуратно, уважно та після ознайомлення із приладами, властивостями речовин і правилами безпеки [45].

Перед початком роботи треба: отримати дозвіл на виконання роботи, одягти спеціальний одяг, ознайомитись із правилами безпеки, обладнанням, матеріалами та інструментами. У лабораторії не можна працювати одному - наявність другої особи необхідна для надання допомоги при нещасних випадках. Працювати необхідно у зручному одязі, який не стримує рухів, мати окремий рушник для витирання рук, індивідуальні окуляри. Необхідно перевірити на справність прилади: цілісність дротів, заземлення (занулення). Упевнитись в наявності засобів гасіння вогню і надання першої допомоги [46].

При роботі з хімічними реактивами обов’язковий спецодяг згідно ст. 163 кодексу законів про працю України і ДНАОП 0.00-4.26-96 [44]. У тканині не повинно бути добавок синтетичних волокон, тому що у випадку займання оплавлені частини халату важко видалити з одягу та поверхні шкіри.

При проведенні дослідів застосовується хімічний посуд загального і спеціального призначення, зокрема пробірки. Неприпустимо, щоб пробірка була наповнена до країв, що може призвести до проливання і попадання рідин на шкіру. При митті посуду треба стежити за тим, щоб йорж не вдарявся об дно і стінки посуду, що може призвести биття скляних предметів та травмування. У раковину забороняється виливати і видаляти концентровані розчини кислот і лугів, отруйні речовини тому, що можливе їх випаровування й отруєння повітря лабораторії та прилеглих приміщень [46,47].

При написанні цієї роботи мені довелося працювати із електроприладами. Усі мої дії підпорядковувалися вимогам ДНАОП 0.00-1.21-98 «Правила безпечної експлуатації електроустановок споживачів» [44]. З усіма приладами я працювала у присутності лаборанта та чітко дотримуючись інструкцій та паспортів заводу-виробника. Після закінчення дослідів прилад відключали від електромережі. Після виконання роботи реактиви та скляний посуд зберігаються відповідно вимогам. Обов’язково оглянути приміщення, перевірити чи всі реактиви на своїх місцях, вимкнути електроживлення [45,46].

Під час проведення дослідження трапляються нещасні випадки, пов’язані з недотриманням правил техніки безпеки при використанні реактивів, апаратів і роботі з комп’ютером. До випадків, які можуть статися при виконанні моєї роботи, відносяться хімічні опіки, попадання біологічних рідин на одяг, шкіру і слизові оболонки, електротравми. Тому важливо знати способи до лікарняної допомоги при цих випадках, щоб зарадити їм і їхнім наслідкам.

Хімічні опіки виникають при потраплянні на шкіру розчинів сильних кислот, лугів, солей деяких важких металів. Невідкладна допомога: одяг, промочений хімічною речовиною, негайно видаляють, при цьому рятівник повинен працювати в гумових рукавичках. Уражену ділянку поливають великою кількістю проточної води впродовж 10 – 15 хв. нейтралізують хімічний агент при опіках кислотою 4 % розчином соди, а при опіках лугом – слабкий розчин оцтової кислоти [50].

При роботі з сироваткою крові можливе її потрапляння на шкіру, одяг, слизові оболонки. При потраплянні біологічного матеріалу на слизову оболонку очей потрібно промити поверхню великою кількістю води і закапати 30 % р-ном альбуциду, якщо сироватка крові потрапила на слизові оболонки ротової порожнини, потрібно прополоскати 70% розчином спирту. Про всі випадки аварії потрібно повідомляти керівництво лабораторії. При потраплянні сироватки на халат, потрібно його зняти і замочити у дезінфікуючому розчині на 1 годину.

Електротравми можуть виникати при пошкоджуючій дії напруги. По-перше, для зупинення дії струму краще всього вимкнути рубильник, вивернути пробки, вільнити потерпілого від електричного проводу. Для цього потрібно одягти гумові рукавички, користуватися сухою дерев’яною палкою. Не можна доторкатися до потерпілого голими руками. По-друге, при відсутності ознак життя потрібно почати проведення реанімаційних заходів. По-третє, якщо дії виявилися успішними, необхідно, накласти асептичні пов’язки на «мітки струму», які є опіками, і відвезти потерпілого в лікарню [50].

Пожежна безпека об’єкту регламентується Законом України «Про пожежну безпеку» від 17.12.93 року, Правилами пожежної безпеки України, затвердженими 13.06.95 року наказом № 400 МВС України та інструкціями.

Лабораторія повинна забезпечуватися системою запобігання пожежі та системою пожежного захисту. Первинні засоби пожежогасіння: вогнегасники, ящик з піском і совком, покривало з вогнетривкого матеріалу розміщують безпосередньо в лабораторії. До них необхідно забезпечити вільний доступ. У разі виникнення пожежі необхідно повідомити пожежну охорону (тел.101); вжити заходів щодо евакуації людей з приміщення; вимкнути електромережу.

Перша допомога починається з того, що потерпілого виносять на свіже повітря або забезпечують притік свіжого повітря. Якщо потерпілий не дихає самостійно, починають штучне дихання, а при зупинці кровообігу ‒ непрямий масаж серця. Викликають бригаду швидкої допомоги [44, 49,51].

Обробка результатів проводилася з застосуванням комп'ютерної техніки. До роботи на комп’ютері допускаються особи, що пройшли навчання та інструктаж з охорони праці, знають міри захисту та прийоми надання першої допомоги при ураженні електричним струмом [44,45]. Площа, що припадає на одного працюючого з дисплеєм, повинна бути не менше 6,0 м2, відстань між робочими місцями ‒ не менше 1,5м. Температура повітря в дисплейних залах 22-24°С, швидкість руху повітря не менше 0,2 м/с. Необхідно проводити вологе прибирання і регулярне провітрювання. Освітлення робочих місць в горизонтальній площині на рівні 0,8 м від підлоги повинно бути не менше 400 лк. Відстань від очей користувача до екрану дисплея повинна становити 50 – 70 см, кут зору 10-200. Переважним є розташування площі екрана перпендикулярно до лінії зору. В продовж зміни потрібно обмежувати сумарний час роботи за відео матеріалами до 50 % [42].

Різні види робіт вимагають особливого підходу в організації перерв. Для робіт з великим навантаженням рекомендується 10-15 хв. через кожні 2 години. Кількість пауз тривалістю 2 хв. регулювалися індивідуально, а після двох годин роботи влаштовувала перерву в роботі (10-15 хвилин), під час якої виконувала гімнастичні вправи для зняття напруження з м'язів та зорової втоми [44].

Під час роботи на комп'ютері необхідно суворо дотримуватися інструкції з експлуатації апаратури, працювати на клавіатурі чистими сухими руками, коректно завершувати роботу з тим чи іншим програмним засобом [51]. Гігієнічні вимоги до персональних комп’ютерів визначаються санітарними нормами та правилами СН 2.2.2.542-96 [44].

Під час роботи комп'ютера екран дисплея є джерелом електромагнітного випромінювання, яке руйнує зір, викликає втому, знижує працездатність. Тому очі знаходилися на відстані 60-70 см від екрана, а безперервна робота за комп'ютером тривала не більше 40-45 хв. [49,51].

Таким чином, завдяки теоретичному курсу «Охорона праці», всі набуті теоретичні знання я використала на практиці, і звела до мінімуму ризик при проведенні досліджень для написання моєї кваліфікаційної роботи.

ВИСНОВКИ

1.Згідно джерел літератури щур найчастіше використовується в біології та медицині завдяки зручності змісту і експериментальних маніпуляцій з ним. Медична п'явка з античних часів застосовується для лікувальних цілей. В даний час її застосування збільшилося серед терапевтичних методів.

2. Порівняльний аналіз кількості форменних елементів витікаючої крові з ранки щура та відцідженої крові з ШКТ МП одразу після відпадання від тіла щура, виявляли їх підвищення за рахунок концентрації крові шляхом абсорбції рідкої частини плазми з шлунку та транспортування її на зовні, як філогенетична особливість годування МП як абсолютного гемофага. Повторна ГП супроводжувалась збільшенням кількості лейкоцитів та еритроцитів з відтікаючої крові ранки щура за рахунок підвищення місцевого кровопостачання після першої ГП.

3. ГВ супроводжувався порівняльним збільшення шлунковій крові як наслідок їх локального підвищення у щура.

4. Комп’ютерний прогноз показав наявність 70 різноманітних видів біологічної дії для 6-бромхінолінів. Найбільш перспективними для подальших біологічних досліджень виявились антиоксидантна, діуретична, антимікробна та аналгезуюча дії.

6. Сполуки проявляють помірну токсичність. При порівняльному аналізу даних літератури введення атому брому привело до збільшення токсичності сполук, що можна пояснити збільшенням ліпофільності речовин. Дослідження антиоксидантної активності, проведене на моделі ініціації вільнорадикального окислення, а саме інгібування супероксидрадикалу, показало найбільшу антиоксидантну дію для 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти, яка була на рівні речовин порівняння. Встановлено експериментальне підтвердження даних комп’ютерного прогнозу програми PASS.

7. Курсове уведення 6-бромпохідних-4-тіохіноліну в дозі 1 мг не приводило до достовірних змін загальної кількості лейкоцитів в периферичній крові та окремих морфологічних форм відносно відповідних значень в контрольній групі. Лише порівняно із вихідним рівнем спостерігалося статистично значиме зниження кількості ПЯН, поміж цього відмічалося достовірне зростання моноцитів та лімфоцитів на другу добу уведення, а на сьому їх достовірне зниження.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦЇЇ

Подальші дослідження були б цікаві з точки зору поглибленого дослідження антиоксидантної, антимікробної та імунотропної дії 6- бромозаміщених-4-тіохіноліну. Для подальшої діагностики та застосування у гірудології.

Отримані результати кваліфікаційної роботи можна використовувати в курсах «Імунології», «Великий практикум з імунології» та «[Біохімічні методи лабораторної діагностики](https://moodle.znu.edu.ua/course/view.php?id=9215)».

.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Баренбойм Г. М. Биологически активные вещества. Новые принципы поиска: ученик. Москва : Наука, 1986. 256 с.
2. Арчаков А. И. Биоинформатика. Новые биомедицинские технологии: монографія. Москва : НИИ биомедицинской химии РАМН, 1999. 47 с.
3. Коваленко С. І. Синтез, фізико-хімічні властивості та протимікробна активність гідразидів та іліденгідразидів N-(хіназоліл)-амінокарбонових кислот. *Фармацевтичний журнал*. 2001. №3. 59 с.
4. Носова Э. В. Синтез и антибактериальная активность производных 1,3,4-тио(окса) диазино (6,5,4,) хинолина. *Химико-фармацевтический журнал*. 2001. №11. 15 с.
5. Лупинова Г. Н. Противоопухолевая активность фторированных производных хинолинов и хиназолинов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2000. №1. 23 с.
6. Яременко В. Д. Синтез, будова та біологічна активность R-іліденгідразидів-2-метил-6нітроксаніловойкислоти. *Фармацевтичний журнал.* 2001. №4. 63–65 с.
7. Ісаєв С. Г. Синтез, будова та біологічна активность 9-N-(пара - (диметиламіно) - бензиліден) – гідразино – 5 – нітро- акридінів. *Фармацевтичний журнал*. 2000. №1. 72–74 с.
8. Машковский М. Д. Лекарственные средства : пособие по фармакопее для врача : в 2 т. Москва : Новая волна, 2001. Т. 1. 624 с.
9. Рахманов А. И. Декоративные мыши и крысы: ученик Москва: Аквариум, 2000. 144с.
10. Антонов Б. И. Лабораторные исследования в ветеринарии: практикум. Москва: Агропроиздат, 1991. 51 с.
11. Соколов В. Е.  Систематика млекопитающих. Отряды зайцеобразных, грызунов: ученик. Москва : Высшая школа, 2015.  494 с.
12. Бююль А., SPSS: искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей: учебник Спб. : ООО ДиаСофтЮП, 2005. 608 с.
13. Абрамов М. Г. Гематологический атлас: практикум. Москва : Медицина, 1985. 432 с.
14. Fields W.S. The history of leeches and hirudin. *Haemostasis.*1991. 3 р.
15. *Исаханян Г. С*. Гирудотерапия. Наука и практика: монографія. Москва : Весь, 2004. 506 с.
16. Щекотов Г. М. Применение медицинских пиявок при варикозном расширении вен. *Военно-медицинский журнал*. 1980. № 3.
17. Bazyluk W. Przyczynek do znajomosci fauny pijawek (Hirudinea) *Pod-lasia Fragmenta faunistica Musel Zoologici Polonici*. 2010. 133 р.
18. Kalbe L. Zur Okologie und Saprobiewertung der Hirudineen im Havel-gebiet Internationale Revue. *Hydrobiologie*. 2014. 277 s.
19. Рошш B. C. Морфологические изменения лейкоцитов: лабораторное дело. Москва : Медицина, 2015. 34 с.
20. Машковский М. Д. Лекарственные средства: Пособие по фармакопее для врача. Москва : Новая волна, 2012. 1216 с.
21. Беликов В. Г. Фармацевтическая химия : учебное пособие : в 2 ч. Москва : МЕДпресс-информ, 2009. 616 с. 96.
22. Муравьева Д. А. Фармакогнозия. Москва : Медицина, 2002. 654 с.
23. Baskova I.P., Nikonov G.I. Potential medicines on the base of the medicinal leeches. 2-nd Mediterranean Congress of Angiology, Turkey 28 березня 2014 р. 2014. Turkey
24. Катков  Ю. А., Калмыков В. Л. Способность обучения крыс с различной устойчивостью к стрессовым воздействиям и ее связь с уровнем биогенных аминов мозга. В сборнике: Память и следовые процессы. Тезисы докладов ЛУ Всес.конф. Пущино-на-Оке, 1979, 56 с..
25. Gong D., Geng C. Effects of hydroxytyrosol-20 on carrageenan-induced acute inflammation and hyperalgesia in rats. *Phytother Res.* 2009. 72–74 с.
26. Семикова Т. С., Бондаҏева В. Г. Гирудотерапия в офтальмологии: методические ҏекомендации для практических врачей. Москва : Весь, 2015. 124 с.
27. Каменев О. Ю., Барановский А. Ю. Лечение пиявками – теория и практика гирудотерапии: учебник. СПб : Весь, 2010. 302 с.
28. Запорожан В. М., Напханюк В. К. Морфологія клітин крові лабораторних тварин і людини: атлас. Москва : Новая волна, 2002. 118 с.
29. Каркищенко Н. Н., Грачев С. В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях Москва : Профиль-2 С, 2015. 22 с
30. Каменев Ю*.,* Вам поможет пиявка: практическое руководство по гирудотерапии.  СПб : Весь, 2014. 192 с.
31. Загороднюк І., Харчук С. Називничі засади опису таксономічного різноманіття ссавців Європи. *Науковий вісник НУБіП України*. *Серія: лісівництво та декоративне садівництво.*  2011.  Вип. 164, частина 3. 124-135 с.
32. Западнюк И. П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте: навчальний посібник. Київ :Вища школа, 1983. 383 с.
33. Котенкова Е. В.,[О крысах и мышах](http://www.sivatherium.narod.ru/library/kotnkova/part_01.htm): учебник  Москва: [Наука](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9D%D0%B0%D1%83%D0%BA%D0%B0_(%D0%B8%D0%B7%D0%B4%D0%B0%D1%82%D0%B5%D0%BB%D1%8C%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%BE)), 1989.  176 с.
34. Фролов О. К. Основи імунології : навчальний посібник для студентів біологічного факультету денної та заочної форм навчання. Запоріжжя : ЗНУ, 2007. 84 с.
35. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология: ученик. Пер. с англ. Москва: Мир, 2000.592 с.
36. Физиологические показатели нормы животных: ученик. Москва: Аквариум, 2001. 256 с.
37. Справочник ветеринарного лаборанта: справочник. Москва : Колос, 1981. 241 с.
38. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник. Москва : Медицина, 1987. 368 с.
39. Medicinal Leeches. Antichymortypsin Activity of Partially Purified Preparations of Hirudin and Pseudohirudin. Folia Haematol., Leipzig, 2008, 111, 6, 831-837.
40. ДСН 3.3.6.042 99. Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень: [Чинний від 1999–12–01]. Вид. офіц. Київ: МОЗ України 1999. 10 с.
41. ДСТУ 12.1.005–88. Загальні санітарно–гігієнічні вимоги до повітря робочої зони:[Чинний від 1989–01–01]. Затв. МЗ СРСР у 1988 р. 70 с.
42. СНІп 2.04.05–91. Опалення, вентиляція і кондиціонування:[Чинний від 1996–06–27]. Вид. офіц. Київ ЗНІІП, 1996. 89 с.
43. ДБН В.2.5–28–2006. Природне і штучне освітлення. [Чинний від 2006–10–01]. Вид. офіц. Київ : МінБуд України, 2006. 128 с.
44. Савчук О. М. Основи охорони праці: конспект лекцій в 2–х ч. Запоріжжя: Просвіта, 2000. 124с.
45. ДНАОП 0.00–1.21–98. Правила безпеки експлуатації електроустановок споживачів. [ Чинний від 1998–01–09]. ]. Вид. офіц. Київ: Міністерство юстиції України, 1998. 394 с.
46. ДСТУ 2293–99. Охорона праці. Терміни і визначення: [Чинний від 2000–01–01]. Вид. офіц. Київ : Держспоживстандарт України, 1999. 21с
47. Александрова М.М. Первая помощь при ожогах : учебн. пособие для студентов пед. институтов по химии. Москва : Здоровье, 1990. 150 с.
48. ДНАОП 2.2.30-80. Надання першої допомоги при електроураженнях: [Чинний від 1980–04–10]. Затверджено наказом від 1980. 12 с.
49. Шевченко А. М., Яворівський О. П. Гігієна праці. Вінниця : Нова книга, 2005. 84с.
50. ДОДАТКИ

Додаток А



Примітки:

1. 1 – контроль; 2 – через 2 доби після уведення речовини; 3 – через 7 діб після уведення речовини;
2. P1-2 > 0,05; P1-3 > 0,05; P2-3 > 0,05;

Рисунок А.1‒ Зміни кількості лейкоцитів при уведенні 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти

Додаток Б

|  |  |
| --- | --- |
|  | |
|  |  |
| Примітка: P1-2 < 0,01; P1-3 < 0,01; P2-3 > 0,05 - для ПЯН; р > 0,05 – для еозинів  та СЯН | |

Рисунок Б.2 ‒ Зміни відносної кількості гранулоцитів при уведенні 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти

Додаток В

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| P1-2 > 0,05; P1-3 > 0,05; P2-3 < 0,01 | P1-2 < 0,01; P1-3 > 0,05; P2-3 < 0,01 |

Рисунок В.3 ‒ Зміни відносної кількості агранулоцитів при уведенні 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти

Додаток Г

|  |  |
| --- | --- |
|  | |
|  |  |
| Примітка: P1-2 < 0,01; P1-3 < 0,01; P2-3 > 0,05 - для ПЯН; р > 0,05 – для еозинів  та СЯН | |

Рисунок Г.4 ‒ Зміни абсолютної кількості гранулоцитів при уведенні 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти

Додаток Д

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| P1-2 < 0,05; P1-3 > 0,05; P2-3 < 0,01 | P1-2 < 0,01; P1-3 > 0,05; P2-3 < 0,01 |

Рисунок Г.4 ‒ Зміни абсолютної кількості агранулоцитів при уведенні 2-метил-6-бром-4-S-хінолін оцтової кислоти