

ИССЛЕДОВАНИЕ ВСАСЫВАНИЯ ДЕКАМЕТОКСИНА В КИШЕЧНИКЕ У КРЫС И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА АКТИВНОСТЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В КРОВИ КРОЛИКОВ

УДК 615.24

© Н. Н. Деркач, С. Ю. Штрыголь, О. О. Койро, Н. Е. Блажеевский

Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков

Ключевые слова:

декаметоксин; всасывание; кишечник; холинэстераза.

Резюме

Исследована способность декаметоксина (0,02%-й раствор) всасываться в условиях перфузии тонкой кишки *in situ* в опытах на белых крысах. В перфузате определяли содержание декаметоксина энзимо-кинетическим методом по реакции ингибирования экзогенной холинэстеразы. Изучено также влияние декаметоксина на активность эндогенной холинэстеразы плазмы крови у кроликов после однократного орального введения 6 мл/кг, что соответствует дозе декаметоксина 1,2 мг/кг. Установлено, что декаметоксин практически не всасывается в кишечнике у крыс и не влияет на активность холинэстеразы в крови кроликов, что обосновывает возможность его применения для лечения кишечных инфекций.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск эффективных и безопасных препаратов для лечения кишечных инфекций является актуальной задачей [15]. Как один из путей её решения привлекает внимание возможность использования декаметоксина для приема внутрь.

Декаметоксин относится к числу поверхностно-активных катионных детергентов с широким спектром бактерицидного, противовирусного, противогрибкового действия, способностью разрушать микробные токсины [5, 12, 17]. Он обладает противовоспалительными свойствами [13], проявляет антихолинэстеразную активность [1–4]. В форме 0,02%-го изотонированного раствора «Декасан» («ЮРИЯ-ФАРМ», Киев, Украина) этот препарат нашел широкое применение при гнойно-септических хирургических заболеваниях, в нейрохирургической, стоматологической, оториноларингологической, урологической, гинекологической, пульмонологической практике в виде промываний, орошений, полосканий, ингаляций [6–9, 11, 12, 14, 18]. Известно эффективное использование раствора декаметоксина для длительного капельного орошения зоны дигестивного анастомоза для профилактики осложнений, связанных с несостоятельностью швов [10].

Возникает вопрос о возможном резорбтивном действии декаметоксина при введении в желудочно-

кишечный тракт. С этой целью в настоящей работе исследована его способность всасываться в кишечнике крыс и влиять на активность холинэстеразы (ХЭ) крови кроликов после однократного орального введения.

МЕТОДИКА

Опыты выполнены на 5 белых рандомбредных крысах-самцах массой 180–200 г и на 8 кроликах породы Шиншилла массой 2,8–3 кг. За 18 ч до начала эксперимента животных ограничивали в еде, но оставляли свободный доступ к воде.

Крыс наркотизировали (тиопентал-натрий в дозе 60 мг/кг внутривенно), выполняли срединную лапаротомию. В 5 см и 20 см дистальнее двенадцатиперстной кишки накладывали две лигатуры так, чтобы изолировать 15 см тонкого отдела кишечника с сохраненными кровоснабжением и иннервацией. В проксимальный и дистальный концы изолированного участка кишки вводили по катетеру, что обеспечивало возможность перфузии. Брюшную полость ушивали. Изолированный участок кишки перфузировали раствором «Декасан», содержащим 0,02% декаметоксина, с помощью инфузионного насоса NE-300 (New Era Pump System Inc., США) на протяжении 30 мин. Скорость инфузии составляла 0,1 мл/мин. В перфузате определяли содержание декаметоксина по реакции ингибирования экзогенной ХЭ высокочувствительным энзимо-кинетическим методом [1–4, 16]. Сравнивали степень ингибирования реакции в присутствии перфузата и раствора «Декасан», содержащего известное количество декаметоксина (0,02%), что позволило определить содержание последнего в перфузате. Снижение концентрации декаметоксина в перфузате по сравнению с таковым в исходном растворе указывает на всасывание этого соединения в кишечнике крыс.

Кроликов разделили на контрольную и экспериментальную группы (по 4 животных). В экспериментальной группе способность препарата «Декасан» всасываться в кровь определяли по влиянию на активность ХЭ через 30 и 60 мин после однократного перорального введения в дозе 6 мл/кг, что соответствует 1,2 мг/кг декаметоксина. Пробы крови из краевой вены уха брали до, через 30 и 60 мин

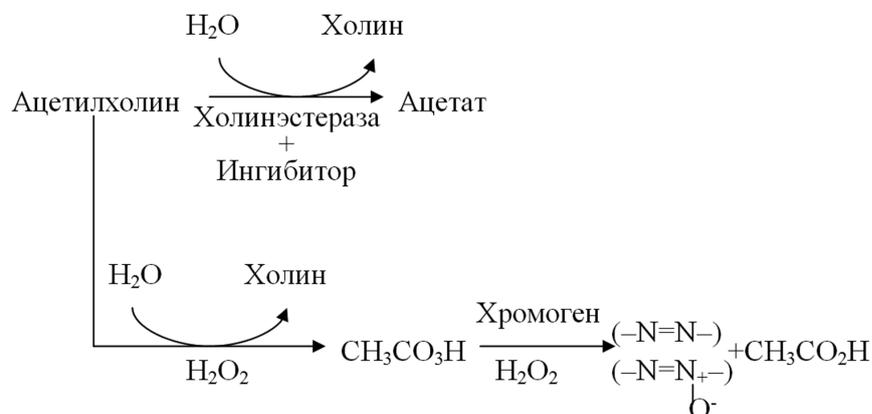
после введения раствора «Декасан». С животными контрольной группы проводили аналогичные процедуры, но вместо раствора «Декасан» вводили 0,9%-й раствор натрия хлорида. Получали плазму крови, используя в качестве антикоагулянта гепарин *in vitro*.

В качестве индикаторной реакции на ацетилхолин использовали реакцию окисления *p*-фенетидина перуксусной кислотой ($\text{CH}_3\text{CO}_3\text{H}$), образованной *in situ* во вспомогательной реакции пергидролиза (с избытком пероксида водорода) ацетилхолина — субстрата ферментативной реакции [1–3]. Схема метода представлена на рисунке 1. Использованы раствор ХЭ 200 АО/мл (ацилгидролаза сыворотки крови лошади К.Ф.3.1.1.8 НВО «Биомед», Россия VI кл., флакон по 80 мг с активностью 25 АО/мг) и раствор субстрата — ацетилхолин. Определение проводили спектрофотометрически при 358 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Скорость данной реакции характеризует тангенс угла наклона прямолинейного начального участка кинетической кривой после индукционного периода в координатах «оптическая плотность продукта окисления *p*-фенетидина — время».

Активность ХЭ в крови кроликов определяли описанным выше энзимо-кинетическим методом, основанным на использовании в качестве индикаторной реакции на ацетилхолин окисление *p*-фенетидина (Хромоген) перуксусной кислотой, образованной в начальной реакции пергидролиза (с избытком пероксида водорода), что позволяет контролировать активность фермента ХЭ в присутствии экзогенного ингибитора — декаметоксина (Ингибитор) [1, 16]. Снижение активности ХЭ через 30 и 60 мин после введения животным раствора «Декасан» по сравнению с исходной и таковой у животных контрольной группы служило маркером всасывания декаметоксина в желудочно-кишечном тракте.

Выполняли следующие опыты:

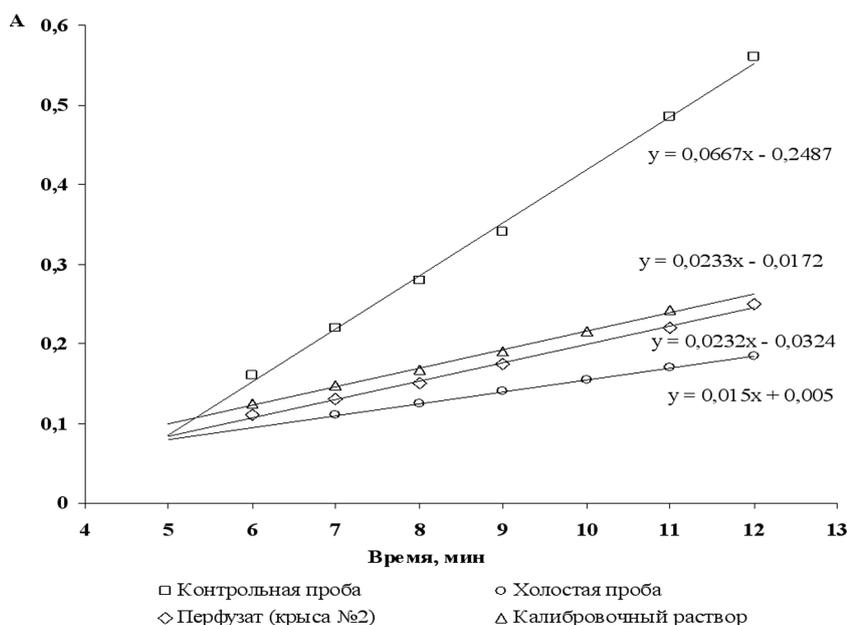
1. Контрольный опыт, который позволяет построить кинетические кривые сопряженного окисления индикаторного вещества *p*-фенетидина пероксидом водорода в присутствии не подвергшегося



■ Рисунок 1. Схема определения антихолинэстеразной активности ингибиторов по неизрасходованному ацетилхолину с использованием индикаторной реакции сопряженного окисления *p*-фенетидина (хромоген) пероксидом водорода

гидролизу ацетилхолина. В опыте отсутствуют ХЭ и ее ингибитор декаметоксин. Кривая контрольного опыта характеризуется максимальным значением тангенса угла наклона, поскольку весь внесенный в пробу ацетилхолин не подвергается ферментативному гидролизу и полностью расходуется на реакцию пергидролиза, а также последующего окисления образованной *in situ* перуксусной кислотой индикаторного вещества *p*-фенетидина. Значение тангенса угла наклона ($\text{tg}\alpha_k$), соответствует условно 100% ингибированию ХЭ.

2. Холостой опыт, который позволяет построить кинетические кривые сопряженного окисления *p*-фенетидина пероксидом водорода в присутствии субстрата ферментативной реакции (ацетилхолина) и фермента ХЭ (в опытах на кроликах — эндогенной). Он отражает активность неингибированной ХЭ, принятую условно за 100%, и характеризуется минимальным значением тангенса угла наклона ($\text{tg}\alpha_0$) поскольку в реакции сопряженного окисления *p*-фенетидина пероксидом водорода принимает участие лишь та часть ацетилхолина, которая не подверглась гидролизу ферментом (остатки субстрата).
3. Анализ испытуемой пробы, которая позволяет построить кинетические кривые сопряженного окисления *p*-фенетидина пероксидом водорода в присутствии ацетилхолина и экзогенной ХЭ после инкубирования последней с декаметоксинами, содержащимся в перфузате (в опытах на крысах). В опытах на кроликах в качестве источника ХЭ использовали плазму крови до и через 30 и 60 мин после введения препарата «Декасан» (или 0,9%-го раствора натрия хлорида). Значение тангенса угла наклона кинетической кривой ($\text{tg}\alpha_x$) находится в диапазоне между таковыми контрольного и холостого опытов в зависимости от концентрации декаметоксина в пробе.
4. Анализ калибровочной пробы с заведомо известным содержанием декаметоксина, которая позволяет построить кинетические кривые со-



■ Рисунок 2. Кинетические кривые сопряженного окисления *p*-фенетидина пероксидом водорода в присутствии АХ (контрольная проба), АХ+ХЭ (холостая проба), смеси (ХЭ+«Декасан»)+АХ (калибровочная проба), смеси (ХЭ+перфузат)+АХ (испытуемая проба); АХ — ацетилхолин, ХЭ — холинэстераза

пряженного окисления *p*-фенетидина пероксидом водорода в присутствии ацетилхолина и экзогенной ХЭ после инкубирования последней с раствором «Декасан» с концентрацией декаметоксина 0,02%. Значение тангенса угла наклона кинетической кривой ($\text{tg}\alpha_{\text{ст}}$) находится в диапазоне между значениями тангенсов угла наклона кривых контрольного и холостого опыта.

Количественное содержание декаметоксина в испытуемой пробе рассчитывали по формуле:

$$C_x = [C_{\text{ст}} / (\text{tg}\alpha_{\text{ст}} - \text{tg}\alpha_0)] \times (\text{tg}\alpha_x - \text{tg}\alpha_0), \text{ где:}$$

C_x — концентрация декаметоксина в испытуемой пробе (перфузате), %;

$C_{\text{ст}}$ — концентрация декаметоксина в растворе «Декасан», %;

$\text{tg}\alpha_x$ — тангенс угла наклона кинетической кривой испытуемой пробы (с экзогенной ХЭ);

$\text{tg}\alpha_{\text{ст}}$ — тангенс угла наклона кинетической кривой калибровочной пробы (раствора «Декасан» с экзогенной ХЭ).

Для статистической обработки результатов опытов на крысах использовали парный критерий Вилкоксона, с помощью которого оценивали различия концентрации декаметоксина в исходном растворе «Декасан» и перфузате кишечника. В опытах на кроликах оценивали межгрупповые различия с использованием критерия У Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На рисунке 2 приведены кинетические кривые, полученные в опыте с перфузией кишечника крыс. Значения тангенса угла наклона испытуемых проб и результаты количественного определения содержания декаметоксина в перфузате кишечника крыс представлены в таблице 1.

Содержание декаметоксина в растворе «Декасан» составляет 0,200 мг/мл, в перфузате — $0,195 \pm 0,003$ мг/мл. Данные о содержании декаметоксина в готовой лекарственной форме взяты из сертификата качества № 1724 на используемый

■ Таблица 1. Изучение содержания декаметоксина в перфузате кишечника крыс

Исследуемые растворы	№ п/п животного	tgα	Содержание декаметоксина в пробе		Среднее значение содержания декаметоксина, мг/мл
			%	мг/мл	
Аликвота перфузата кишечника крыс	1	0,0215	0,019	0,185	0,195 ± 0,003
	2	0,0232	0,020	0,199	
	3	0,0229	0,020	0,197	
	4	0,0234	0,020	0,201	
	5	0,0225	0,019	0,193	
Раствор «Декасан»	—	0,0233	0,020	0,200	0,200

tgα — тангенс угла наклона кинетической кривой

■ **Таблица 2. Значения тангенсов угла наклона кинетических кривых проб и изменения тангенса угла наклона кинетической кривой, соответствующее изменению активности холинэстеразы на 1%, под влиянием препарата «Декасан» (0,02% раствор декаметоксина)**

№ п/п	Значение tgα				Δtg _{1%}
	Контрольная проба, tgα _к	Исходное состояние (холостая проба), tgα ₀	Через 30 мин после введения препарата, tgα ₃₀	Через 60 мин после введения препарата, tgα ₆₀	
	0,0677	–	–	–	
Контрольная группа (животные, получавшие 0,9% раствор натрия хлорида)					
1	–	0,0305	0,0274	0,0280	0,000372
2	–	0,0307	0,0278	0,0303	0,000370
3	–	0,0305	0,0281	0,0317	0,000372
4	–	0,0306	0,0273	0,0301	0,000371
Опытная группа (животные, получавшие раствор «Декасан»)					
1	–	0,0284	0,0273	0,0297	0,000393
2	–	0,0313	0,0237	0,0299	0,000364
3	–	0,0316	0,0313	0,0276	0,000361
4	–	0,0273	0,0237	0,0316	0,000404

Исходная активность ХЭ, определенная в плазме крови кроликов до введения «Декасана», принята за 100%. Относительное изменение активности ХЭ после введения «Декасана» рассчитывали по формуле:

$$\Delta U_{ХЭ} = (tg\alpha_x - tg\alpha_0) / \Delta tg_{1\%}, \text{ где:}$$

$\Delta U_{ХЭ}$ — относительное изменение активности холинэстеразы по сравнению с исходным состоянием, %;

$tg\alpha_0$ — тангенс угла наклона кинетической кривой холостой пробы;

$tg\alpha_x$ — тангенс угла наклона кинетической кривой испытуемой пробы через 30 или 60 мин после введения раствора «Декасан» или 0,9%-го раствора натрия хлорида;

$\Delta tg_{1\%}$ — изменение тангенса угла наклона кинетической кривой, соответствующее изменению активности ХЭ на 1%;

При этом относительная активность ХЭ в процентах составляет:

$$U_{ХЭ} = 100 - \Delta U_{ХЭ}, \text{ где:}$$

$\Delta U_{ХЭ}$ — изменение активности ХЭ по сравнению с исходным состоянием, %;

100 — исходная активность ХЭ, принятая за 100%.

Результаты определения активности ХЭ приведены в таблице 3. Статистически значимых различий активности фермента плазмы кроликов после введения раствора «Декасан» между контрольной и опытной группами не обнаружено. Это свидетельствует об отсутствии всасывания декаметоксина из желудочно-кишечного тракта кроликов, что подтверждает приведенные выше данные об отсутствии его всасывания из тонкой кишки крыс.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты согласуются с данными о зависимости фармакокинетики лекарственных веществ от их физико-химических свойств. Декаметоксин является четвертичным аммониевым основанием [4], а, как известно, полярные соединения плохо проникают через кожу и слизистые оболочки. Отсутствие уменьшения концентрации декаметок-

■ **Таблица 3. Изменение активности холинэстеразы плазмы кроликов в эксперименте под влиянием препарата «Декасан» (0,02%-й раствор декаметоксина)**

Условия опыта, препараты	№ п/п	Активности холинэстеразы плазмы кроликов до и после введения препарата, %			Изменение активности холинэстеразы относительно исходного состояния после введения препарата, %	
		Исходная	Через 30 мин	Через 60 мин	Через 30 мин	Через 60 мин
0,9%-й раствор натрия хлорида	1	100	108,3	106,7	8,33	6,72
	2	100	107,8	101,1	7,84	1,08
	3	100	106,5	96,8	6,45	-3,23
	4	100	108,9	101,3	8,89	1,35
	Среднее	100	107,8±0,5	101,5±2,0	7,88±1,48	1,48±2,04
Раствор «Декасан»	1	100	102,8	96,7	2,80	-3,31
	2	100	120,9	103,8	20,88	3,85
	3	100	100,8	111,1	0,83	11,08
	4	100	108,9	89,4	8,91	-0,64
	Среднее	100	108,4±4,5	100,2±4,7	8,36±4,52	0,24±4,67

сина в перфузате кишечника крыс по сравнению с таковой в исходном растворе «Декасан», а также неизменная активность ХЭ в крови у кроликов после орального введения «Декасана» подтверждает справедливость этого положения. Незначительное (около 8%) увеличение активности ХЭ у кроликов как контрольной, так и опытной группы через 30 мин после введения препарата может быть обусловлено влиянием стресса, вызванного принудительным оральным введением препаратов. На момент окончания эксперимента (через 60 мин после введения) в обеих группах активность ХЭ возвращается к исходному уровню. Это, вероятно, связано с адаптацией животных к условиям опыта.

Результаты исследования служат обоснованием возможности безопасного орального применения декаметоксина с целью лечения кишечных инфекций.

ВЫВОДЫ

1. Концентрация декаметоксина в антимикробном препарате «Декасан» (0,02%-й изотонированный раствор декаметоксина) при перфузии кишечника крыс *in situ* не изменяется.
2. «Декасан» при оральном введении кроликам (6 мл/кг или 1,2 мг/кг декаметоксина) не влияет на активность холинэстеразы в крови.
3. Всасывание декаметоксина из исследуемого раствора «Декасан» в желудочно-кишечном тракте крыс и кроликов при однократном введении практически отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блажеєвський М. Є. Кінетичне визначення активності ферменту холинэстерази за реакцією пероксикислотного окиснення та його застосування у біохімічному методі визначення інгібіторів // *Вопр. хімії та хім. технології*. — 2003. — № 6. — С. 11–18.
2. Блажеєвський М. Є., Дядченко В. В. Кінетичне визначення інгібіторів холинэстераз біохімічним методом із застосуванням реакції окиснення *p*-фенетидину як індикаторної // *Фармац. журн.* — 2004. — № 2. — С. 52–58.
3. Блажеєвський М. Є. Кінетичні методи визначення отруйних речовин за реакціями пергідролізу та пероксикислотного окиснення // *Праці НТШ*. — Львів, 2008. — Т. 21. *Хемія і біохемія*. — С. 150–157.
4. Блажеєвський М. Є., Карпушина С. А., Степаненко В. І., Баюрка С. В. Кількісне визначення декаметоксину у лікарських формах ензимно-кінетичним методом // *Вісник фармації*. — 2007. — № 4 (52). — С. 13–15.
5. Гридін Т. Л., Палій Г. К., Лозицький В. П. Результати дослідження деяких механізмів протівірусної дії декаметоксину та етонію // *Biomedical and Biosocial Anthropology*. — 2008. — № 11. — С. 43–45.
6. Декасан: інструкція по використанню // *Електронний ресурс*. — Режим доступу: <http://tabletki.ua/Декасан>.
7. Дзись Н. П. Морфологічні зміни ендометрію при післяпологових ендометритах і ступінь його

відновлення після місцевого застосування декасану // *Вісник морфології*. — 1997. — Т. 3. — № 1. — С. 24–27.

8. Зарицький О. М., Цвігун Б. Я., Квасневський Ю. А., Сьомко А. М. Застосування антимікробних композицій на основі декаметоксину для лікування гострих епідімітів // *Матеріали українсько-польського симпозиуму урологів (4–6 травня 2007 р., Львів)*. — Львів, 2007. — С. 63–64.
9. Коваленко С. В. Досвід застосування небулайзерної терапії декасаном загострень хронічного бронхіту в умовах пульмонологічного відділення // *Буковинський медичний вісник*. — 2010. — Т. 14, № 4 (56). — С. 175–176.
10. Козань І. В. Пролонговане зрошення зони дигестивних анастомозів як один з методів їх захисту / І. В. Козань, О. З. Бойченко, М. М. Лізунець // *Клінічна хірургія*. — 2006. — № 11–12. — С. 18.
11. Нечитайло М. Ю., Скумс А. В., Огородник П. В. та ін. Комплексне лікування гострого холангіту у хворих на холедохолітіаз // *Клінічна хірургія*. — 2006. — № 11–12. — С. 31.
12. Палій Г. К., Ковальчук В. П., Деркач Н. М., Палій Д. В. Обґрунтування ефективності антисептичного препарату Декасан в лікуванні хворих на гнійно-септичні захворювання // *Український хімотерапевтичний журнал*. — 2010. — № 1–2 (23). — С. 78–82.
13. Поляченко Ю. В. Экспериментально-клиническое обоснование целесообразности применения декаметоксина в комплексном лечении больных посттравматическим остеомиелитом: Автореф. дис... канд. мед. наук. — Киев, 1995. — 16 с.
14. Фомин П. Д., Лисов А. И., Козлов С. Н. и др. Применение антисептика декасан при нагноительных процессах в мягких тканях // *Ліки України*. — Жовтень 2006. — С. 74–75.
15. Ющук Н. Д., Еремушкина Я. М. Основные принципы лечения острых кишечных инфекций // *Фармацевтический вестник*. — 2004. — № 8. — С. 23–26.
16. Blazheyevski M. Ye. The application of kinetic methods in pharmaceutical analysis // *Methods and objects of chemical analysis*. — 2011. — Vol. 6, N 1. — P. 4–15.
17. Fedchuk A. S., Zaritsky V. P., Gridina T. L. Anti-influenza and antiherpetic activity of decametoxin // *Antiviral Research*. — 2003. — Vol. 3. — P. 137.
18. Pedachenko E. G., Malovik V. V., Pedachenko G. A. et al. Use of a new antimicrobial drug decametoxin in neurosurgery // *9th European congress of neurosurgery. Book of abstracts*. — Moscow, 1991. — MKT 19.

THE STUDY OF INTESTINAL DECAMETOXIN ABSORPTION IN RATS AND ITS INFLUENCE ON BLOOD CHOLINESTERASE ACTIVITY IN RABBITS

N. N. Derkach, S. Yu. Shtrygol', O. O. Koyro, N. E. Blazheevskiy

◆ **Summary:** The possibility of (0.02% solution) absorption was evaluated under the conditions of small intestine perfusion *in situ* in the experiments with albino rats. Decametoxin content was determined in the perfusate by kinetic enzymatic method using the reaction of exogenous cholinesterase inhibition. Decametoxin influence on the activity of endogenous cholinesterase of the rabbit blood plasma was also studied after the single oral administration of the drug at a dose of 6 ml/kg that corresponds to the dose of 1.2 mg/kg. It has been shown that decametoxin is almost not absorbed in rat intestine and does not influence on cholinesterase activity of the rabbit blood that

substantiate the possibility of its usage in gastrointestinal infections.

◆ **Key words:** decametoxin; absorbtion; intestine; cholinesterase.

◆ Информация об авторах

Деркач Наталия Николаевна — аспирант кафедры фармакологии. Национальный фармацевтический университет МЗ Украины. 61002, Украина, Харьков, ул. Пушкинская, д. 53. E-mail: d@uf.ua.

Штрыголь Сергей Юрьевич — доктор медицинских наук Украины и России, профессор Украины и России, заведующий кафедрой фармакологии. Национальный фармацевтический университет МЗ Украины. 61002, Украина, Харьков, ул. Пушкинская, д. 53. E-mail: shtrygol@mail.ru.

Койро Ольга Олеговна — к. фарм. н., ассистент кафедры фармакологии. Национальный фармацевтический университет МЗ Украины. 61002, Украина, Харьков, ул. Пушкинская, д. 53. E-mail: olgaokoyro@mail.ru.

Блажеевский Николай Евстахиевич — д. х. н., профессор кафедры физической и коллоидной химии. Национальный фармацевтический университет МЗ Украины. 61002, Украина, Харьков, ул. Пушкинская, д. 53. E-mail: blazejowski@ukr.net.

Derkach Nataliya Nikolaevna — PhD-student. National University of Pharmacy MPH of Ukraine. 61002, Kharkov, Pushkinskaya St., 53, Ukraine. E-mail: d@uf.ua.

Shtrygol' Sergey Yur'yevich — doctor of medical science, professor. National University of Pharmacy MPH of Ukraine. 61002, Kharkov, Pushkinskaya St., 53, Ukraine. E-mail: shtrygol@mail.ru.

Koyro Ol'ga Olegovna — PhD, assistant. National University of Pharmacy MPH of Ukraine. 61002, Kharkov, Pushkinskaya St., 53, Ukraine. E-mail: olgaokoyro@mail.ru.

Blazheevskiy Nikolay Evstakhievich — doctor chemical science, professor. National University of Pharmacy MPH of Ukraine. 61002, Kharkov, Pushkinskaya St., 53, Ukraine. E-mail: blazejowski@ukr.net.