

ГЕСПЕРИДИН, ЯК ОБОРОТНИЙ ІНГІБІТОР, ЩО ЗАПОБІГАЄ ОТРУЄННЮ ФОСФОРОРГАНІЧНИМИ СПОЛУКАМИ

**Бессарабов В.І.^{1,2}, Кузьміна Г.І.², Харитоненко Г.І.², Вахітова Л.М.¹,
Масло П.П.², Дендебера А.С.², Лісовий В.М.², Оболоник А.В.²**

¹Інститут фізико-органічної хімії та вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України, відділ досліджень нуклеофільних реакцій, м Київ, Україна, e-mail: lubovvakhitova@gmail.com

²Київський національний університет технологій та дизайну, кафедра промислової фармації, м Київ, Україна, e-mail: drvib500@gmail.com

У даній статті розглядається ефективність запобігання отруєнь фосфорорганічними сполуками. Досліджується кінетика інгібування гесперидином бутирилхолінестерази сироватки крові людини. В якості речовини фосфорорганічної природи досліджено метилпаратіон. Всі кінетичні дослідження проводилися спектрофотометрично, при довжині хвилі 405 нм і постійній температурі 37 °С. Визначили активність бутирилхолінестерази сироватки крові людини. Розраховали та порівняли константи швидкостей першого порядку (k_H^1) реакції інгібування метилпаратіоном бутирилхолінестерази в концентраціях 50 мкМ, 100 мкМ та 200 мкМ та інгібування цього ферменту при попередньому додаванні гесперидину в концентраціях 50 мкМ, 100 мкМ та 200 мкМ. Встановлено, що гесперидин м'яко інгібує бутирилхолінестеразу сироватки крові людини та частково запобігає необоротньому інгібуванню фермента метилпаратіоном. Сила дії метилпаратіону і гесперидину на бутирилхолінестеразу залежить від концентрації.

Ключові слова: гесперидин, метилпаратіон, фосфорорганічні речовини, бутирилхолінестераза, інгібування.

HESPERIDINE AS A REVERSIBLE INHIBITOR THAT PREVENTS ORGANIC PHOSPHORUS COMPOUND POISONING

**Bessarabov V.I.^{1,2}, Kuzmina G.I.², Kharytonenko H.I.², Vakhitova L.M.¹,
Maslo P.P.², Dendebera A.S.², Lisovyi V.M.², Obolonyk A.V.²**

¹L.M. Litvinenko Institute of Physical-Organic Chemistry and Coal Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Department of Nucleophilic Reaction Research, Kyiv, Ukraine, e-mail: [e-mail: lubovvakhitova@gmail.com](mailto:lubovvakhitova@gmail.com)

This article discusses the effectiveness of preventing organophosphorus poisoning. The kinetics of inhibition of human serum butyrylcholinesterase hesperidin is investigated. Methyl parathion acts as an organophosphorus substance. All studies were performed using a spectrophotometer, at a wavelength of 405 nm, and a constant temperature of 37 ° C. The serum butyrylcholinesterase activity was determined. The rate constants of the first-order (k_H^1) reaction of methyl parathion butyrylcholinesterase inhibition at concentrations of 50 μ M, 100 μ M and 200 μ M and inhibition of this enzyme by previous addition of hesperidin at concentrations of 50 μ M, 100 μ M and 200 μ M were calculated and compared. Hesperidin has shown mild inhibition of human serum butyrylcholinesterase and it partially prevents the irreversible inhibition of the enzyme by methyl parathion. The potency of methyl parathion and hesperidin on butyrylcholinesterase depends on the concentration.

Key words: hesperidin, methylparathion, organophosphorus substances, butyrylcholinesterase, inhibition.

Фосфорорганічні сполуки (ФОС) знайшли широке застосування не тільки у сільському господарстві, а й в медицині та фармацевтиці. Як лікарські засоби ФОС застосовують для лікування глаукоми, міастенії, атонії кишок, хіміотерапії туберкульозу і раку. Гранично допустима концентрація для різних ФОС коливається від 0,02 до 0,5 мг/м³. ФОС абсорбуються через шлунково-кишковий тракт, легені та шкіру. Володіючи достатньо високою токсичністю, вони найбільш часто викликають отруєння у людей [1].

Порушення, викликані дією ФОС на організм людини, надзвичайно складні. ФОС пригнічують бутирилхолінестеразу плазми та еритроцитів, запобігаючи розпаду ацетилхоліну, котрий у зв'язку з цим накопичується в синапсах, тим самим викликаючи необоротні процеси в організмі людини [4]. Складність розвитку цих порушень проявляється через мультифакторний генез захворювань, поліморфізм клінічної симптоматики [2].

Фосфорорганічні сполуки, за винятком деяких (хлорофос), погано розчинні у воді і добре – в органічних розчинниках. ФОС нестійкі в

навколишньому середовищі. Велика частина їх розкладається в рослинах, ґрунті та у воді протягом одного або декількох місяців [3].

На сьогодні особливо важливими та актуальними є дослідження сучасних методів запобігання отруєння ФОС, так як вони недостатньо дослідженні в плані їх можливого реагентного знешкодження [5]. Отже, доцільним є продовження пошуку нових сполук та вдосконалення вже існуючих фармацевтичних композицій, для запобігання отруєння ФОС. Цей напрямок є надзвичайно перспективним для сучасної фармацевтики.

Мета дослідження: визначення кінетики інгібування гесперидином бутирилхолінестерази сироватки крові людини для ефективного запобігання отруєнню фосфорорганічними сполуками.

Матеріали і методи дослідження.

Під час проведення кінетичного дослідження були використані наступні прилади та обладнання: УФ-спектрофотометр «Optizen POP» (Mecasys, Південна Корея), кювета з кварцевого скла з товщиною оптичного шару 1 см, одноканальні автоматичні дозатори 50, 200, 1000 мкл, водяний термостат, таймер.

Реактиви: реактив А: 2,4 мМ гексаціаноферат калію (III) (Sigma-Aldrich, США) розчинний у фосфатному буфері (рН = 7,6); реактив Б (субстрат): бутирилтіохолін йодид – 30 ммоль/л (TCI, Японія); гесперидин (Chemieliva Pharmaceutical Co.); диметилсульфоксид (Sigma-Aldrich, США); метилпараціон (Sigma-Aldrich, США); сироватка крові людини ліофілізована (ERBANORM, Чехія, Erba Lachemas.r.o.).

Дослід виконували за наступним алгоритмом: в пробірку типу *Eppendorf* вносимо 1060 мкл реактиву А, додаємо 30 мкл сироватки крові людини і інкубуємо протягом 5 хвилин при температурі 37 °С, далі додаємо в пробірку зі зразком 450 мкл реактиву Б. Далі вимірюємо абсорбцію розчину проти води очищеної за довжиною хвилі 405 нм, товщиною оптичного шару 1 см та за температури 37 °С. Всі виміри проводимо по три рази.

Другий дослід виконували у присутності метилпаратіону, щоб встановити як саме він впливає на бутирилхолінестеразу сироватки крові людини. Тож вносимо в пробірку 1050 мкл реактиву А, 30 мкл сироватки крові людини і інкубуємо 5 хвилин при температурі 37 °С, далі додаємо 10 мкл метилпаратіону, знову інкубуємо 5 хв, при температурі 37 °С, після цього додаємо 450 мкл реактиву Б, і далі проводимо виміри на УФ-спектрофотометрі. Кожен вимір проводимо по три рази для кожної концентрації метилпаратіону (50, 100, 200 мкМ).

Наступний дослід проводили в присутності гесперидину. До 1040 мкл реактиву А додаємо 30 мкл сироватки крові людини і 10 мкл гесперидину далі інкубуємо 5 хв, при температурі 37 °С. Додаємо 10 мкл метилпаратіону, інкубуємо 5 хв, $t = 37$ °С, додаємо 450 мкл реактиву Б, і проводимо виміри на УФ-спектрофотометрі. Виміри проводимо по три рази для кожної концентрації метилпаратіону та гесперидину.

Параметри дослідів: довжина хвилі – 405 нм, час – 7 хвилин, інтервал – 30 секунд, поправочний коефіцієнт – 0,54054 ммоль/л.

Результати дослідження.

В результаті дослідження було побудовано діаграми зміни активності бутирилхолінестерази в присутності метилпаратіону та з попереднім додаванням гесперидину. Було встановлено вплив метилпаратіону на бутирилхолінестеразу сироватки крові людини.

Зміна активності бутирилхолінестерази після додавання метилпаратіону (50 мкМ, 100 мкМ та 200 мкМ) показана на рисунку 1.

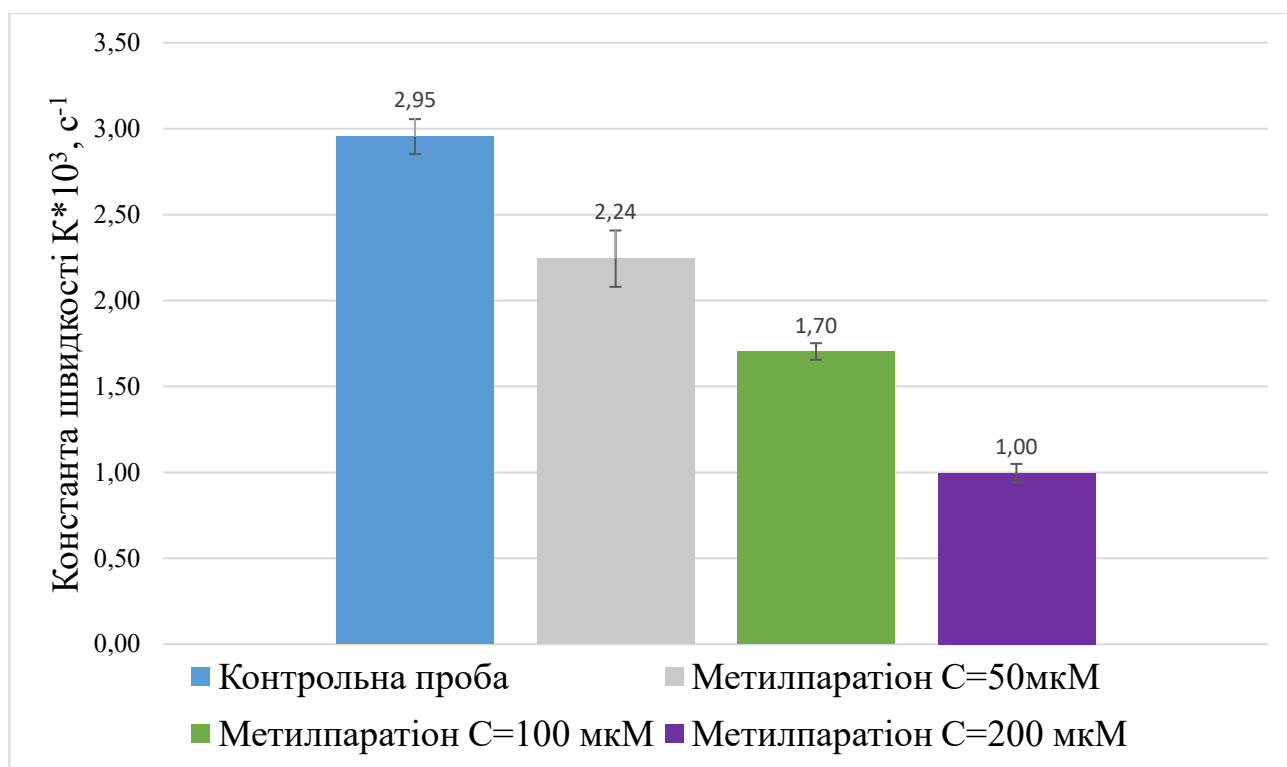


Рисунок 1. Константи швидкості реакції інгібування бутирилхолінестерази сироватки крові людини в присутності метилпаратіону (50, 100, 200 мкМ).

Встановлено інгібування бутирилхолінестерази після додавання метилпаратіону. Для досліджу використовували три різні концентрації фосфорорганічної сполуки метилпаратіону (50, 100, 200 мкМ). На діаграмі видно, що концентрація метилпаратіону 200 мкМ достовірно зменшує ($p \leq 0,05$) активність бутирилхолінестерази майже у 3 рази ($K_{(0)} = 2,95 \cdot 10^{-3} \text{с}^{-1}$; $K_{(m-\text{пар } 200 \text{ мкМ})} = 1,00 \cdot 10^{-3} \text{с}^{-1}$, відповідно).

На наступному етапі досліджень вивчено оборотне інгібування бутирилхолінестерази, з використанням м'якого інгібітора – гесперидину. На рисунку 2 показано зміну активності бутирилхолінестерази сироватки крові людини в присутності метилпаратіону (200 мкМ) з попереднім додаванням розчину гесперидину (50 мкМ, 100 мкМ та 200 мкМ).

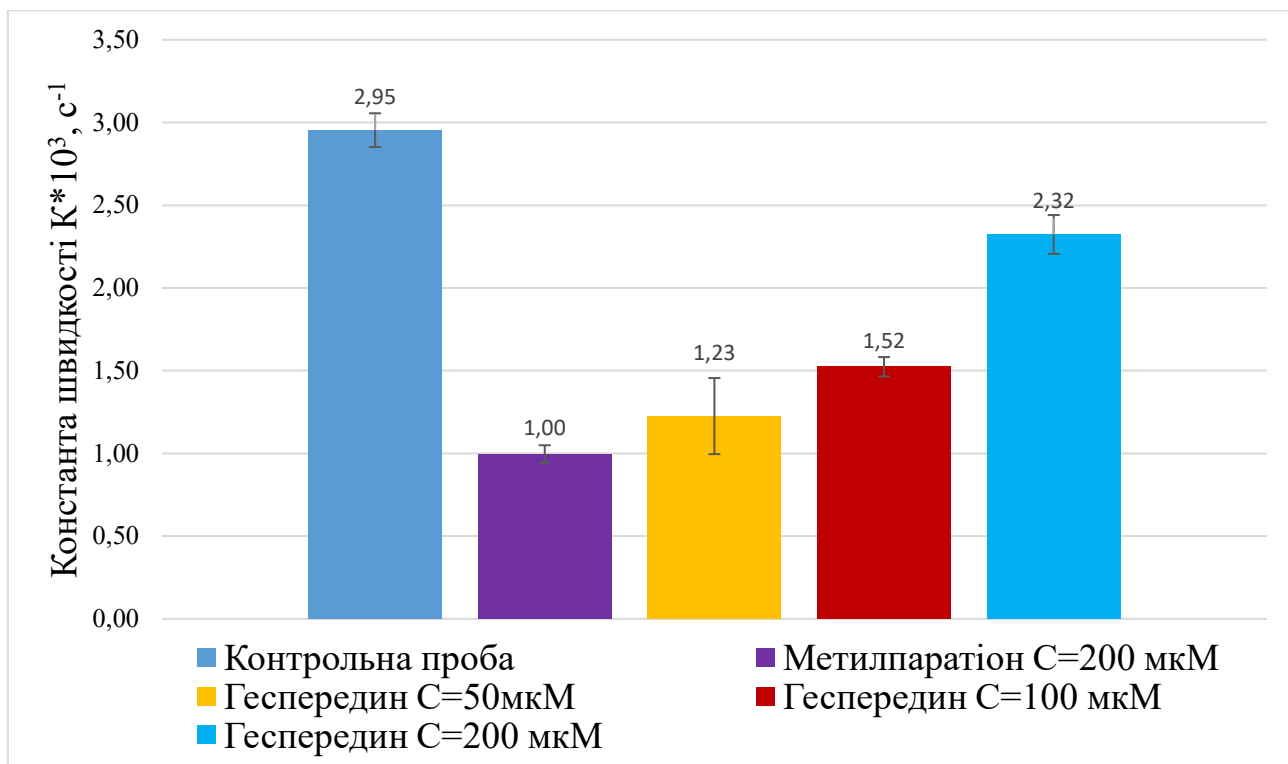


Рисунок 2. Константи швидкості перетворення субстрату бутирилхолінестеразою після додавання метилпаратіону (200 мкМ) з попереднім додаванням гесперидину (50 мкМ, 100 мкМ та 200 мкМ).

При додаванні метилпаратіону в концентрації 200 мкМ активність бутирилхолінестерази різко знизилась. При додаванні метилпаратіону з попереднім додаванням в систему гесперидину в концентрації 200 мкМ, константа швидкості реакції збільшилась у 2,3 рази, а ступінь інгібування БХЕ метилпаратіоном зменшився на 43% ($K_{(м-пар\ 200\ мкМ)}=1,00 \cdot 10^{-3} \text{с}^{-1}$; $K_{(Hes\ 200\ мкМ)}=2,32 \cdot 10^{-3} \text{с}^{-1}$). Гесперидин у концентраціях 50 та 100 мкМ проявляє подібні інгібуючі властивості ($p \geq 0,05$).

Висновки. На сьогодні не існує ефективного лікування отруєнь фосфорорганічними речовинами, тому актуальним є пошук ефективного запобіжного препарату. Аналіз результатів спектрофотометричного дослідження активності бутирилхолінестерази показав, що невелика кількість метилпаратіону веде до необоротного інгібування бутирилхолінестерази. В той же час показано, що при попередньому додаванні гесперидину в систему в концентрації 200 мкМ ступінь

інгібування бутирилхолінестерази зменшується майже на 43%. Таким чином, гесперидин можна розглядати як потенційний активний фармацевтичний інгредієнт для лікарських засобів, призначених для запобігання отруєнь ФОС.

Список літератури.

1. Ткачишин В.С. Інтоксикація фосфорорганічними сполуками. *Гострі та невідкладні стани у практиці лікаря*. 2007. № 5 (7). URL: <https://urgent.com.ua/ru-issue-article-84#Intoksikaciya-fosfororganichnimi-spolukami>
2. В. О. Агеев, Т. Л. Качанова, Б. Ф. Фомин, К. А. Туральчук. Естественная классификация острых отравлений фосфорорганическими веществами. *Известия СПбГЭТУ «ЛЭТИ»*. 2015. № 8. С. 8-16
3. Войтенко Н.Г. Проблемы диагностики при интоксикации фосфорорганическими соединениями / Н.Г. Войтенко, Д.С. Прокофьева, Н.В. Гончаров // *Токсикологический вестник*. 2012. №5 (122). С. 2–6
4. George ST, Varghese M, John L, Balasubramanian AS. Aryl acylamidase activity in human erythrocyte, plasma and blood in pesticide (organophosphates and carbamates) poisoning. *Clin Chim Acta*. 1985 Jan 15;145(1):1-7. doi: 10.1016/0009-8981(85)90013-0. PMID: 3978815.
5. Ранський А. П. Фосфорорганічні пестицидні препарати як об'єкти екологічно безпечної реагентної переробки [Електронний ресурс] / [Ранський А. П., Петрук Р. В., Петрук Г. Д.] // *Збірник наукових статей “ІІІ-го Всеукраїнського з'їзду екологів з міжнародною участю”*. – Вінниця, 2011. – Том.2. – С.617–619. URL: <http://eco.com.ua/>