

ВПЛИВ ФЛАВОНОЇДІВ НА ШВИДКІСТЬ РОЗКЛАДАННЯ НОВОКАЇНУ БУТИРИЛХОЛІНЕСТЕРАЗОЮ

**Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І., Лісовий В.М., Олійник Д.О.,
Атаманчук Д.Ю., Лижнюк В.В.**

Київський національний університет технологій та дизайну, кафедра
промислової фармації, м Київ, Україна, e-mail: iverssia@ukr.net

У статті розглянута роль місцевих анестетиків під час операційного контролю болю, проаналізовані переваги та недоліки застосування новокаїну в хірургічній та клінічній практиці. Проведене лабораторне дослідження кінетики інгібування процесу гідролізу новокаїну бутирилхолінестеразою *in vitro*. Ключовою метою проведення дослідження є збільшення тривалості та якості анестезії. Спираючись на фармакологічні властивості, токсичний потенціал та поширеність, були обрані потенційні інгібітори процесу гідролізу серед флавоноїдів. З використанням методу УФ-спектрофотометрії встановлено різну специфічну активність гесперидину, кверцетину в системі розкладання новокаїну. Наведено порівняльний аналіз процесу інгібування у вигляді графіків залежності величини константи швидкості першого порядку (K_H^1) від концентрації флавоноїдів. Кверцетин демонструє найвдаліші результати випробувань, оскільки чинить найбільший інгібуючий вплив на перебіг процесу, чим підтверджує потенційну здатність подовжити тривалість дії препарату.

Ключові слова: місцеві анестетики, біль, новокаїн, флавоноїди, холінестераза

THE EFFECT OF FLAVONOIDS ON THE SPEED OF DECOMPOSITION OF NOVOCAINE BY BUTYRYLCHOLIN- ESTERASE

**Bessarabov V.I., Kuzmina G.I., Lisovyi V.M., Oliinyk D.O.,
Atamanchuk D.Y., Lyzhniuk V.V.**

Kyiv National University of Technologies and Design, Department of Industrial
Pharmacy, Kyiv, Ukraine, e-mail: iverssia@ukr.net

The article discusses the role of local anesthetics during surgical control of pain, analyzes the advantages and disadvantages of novocaine in surgical and clinical practice. The

kinetics of inhibition of novocaine hydrolysis by butyrylcholinesterase *in vitro* is studied. The main interest was to increase the duration and quality of anesthesia. Based on the pharmacological properties, toxic potential and prevalence, potential inhibitors of the drug hydrolysis process were selected among the flavonoids. Different specific activity of hesperidin, quercetin in the decomposition system was established by UV-spectrophotometry. A comparative analysis of the inhibition of the process in the form of graphs of the dependence of the first-order rate constant (K_H^1) from the concentration of flavonoids. Quercetin shows the most successful test results, as it has the greatest inhibitory effect on the decomposition of novocaine, which confirms the ability to prolong the duration of the drug.

Key words: local anesthetics, pain, novocaine, flavonoids, cholinesterase

Належний операційний контроль болю та лікування хронічних невропатичних больових синдромів являється одним із пріоритетних завдань сучасної анестезіології. Зазвичай це відбувається шляхом застосування місцевих анестетиків, що зумовлюють блокування нервової провідності при хірургічних втручаннях та надають локальний аналгетичний ефект. Відповідно їх практична роль лежить в усуненні болю та полегшенні перебігу періоду реабілітації пацієнта [1].

Більше 20 препаратів із місцево-анестетичними властивостями були введені в клінічну практику анестезіологів за останні 60 років, серед яких найчастіше застосовуються похідні амідів: лідокаїн, прилокаїн, бупівакаїн, ропівакаїн та мепівакаїн. Однак, на нинішній час еталонним знеболювальним препаратом в амбулаторній практиці лишається новокаїн, винайдений в 1905 році німецьким вченим Альфредом Ейнхорном в пошуках заміни кокаїну. З першою появою на фармацевтичному ринку новокаїн почали застосовувати для полегшення хірургічного втручання та терапії болю [2].

З огляду наукової літератури та досвіду застосування його фармакологічна дія і властивості є добре вивчені, зокрема відомі його симпатолітичний, протизапальний та помірний токсичний ефекти, з іншого боку глибина та коротка тривалість знеболювальної дії новокаїну лишилися суттєвим недоліком в порівнянні з іншими більш ефективними

альтернативами, як лідокаїн (ксилокаїн). При звичайних дозах 0,5% розчину новокаїну 0,75 г (150 мл), що вважається безпечною загальною дозою, тривалість інфільтраційної анестезії становить 30-60 хвилин. Це пояснюється структурою новокаїну, що швидко гідролізується під дією ферментів холінестераз людини з подальшим утворенням двох метаболітів: диетиламіноетанолу і параамінобензойної кислоти [3, 4].

Важливу роль в процесі гідролізу місцевих анестетиків відіграє фермент бутирилхолінестераза (BChE), що міститься в сироватці крові людини, печінці, м'язах, підшлунковій залозі, білій речовині мозку і серці. Крім гідролізу новокаїну, біологічна роль бутирилхолінестерази полягає в гідролізі бутирилхоліну та складних ефірів на його основі. Терапевтично BChE застосовується для запобігання токсичності нервово-м'язових блокуючих агентів, також для лікування кокаїнової залежності [5, 6].

Можливість збільшити тривалість та якість дії місцевого анестетику, підкреслює актуальність пошуку інгібіторів процесу розкладання новокаїну бутирилхолінестеразою, як основного ферменту що перешкоджає довготривалій анестезії.

В якості потенційних інгібіторів бутирилхолінестерази розглянуті похідні групи флавоноїдів: гесперидин, кверцетин, які входять в склад більшості сучасних венотонізуючих препаратів з вираженими капіляростабілізуючими та ангіопротекторними властивостями. Вплив на здоров'я залежить від споживаної кількості та біодоступності діючих речовин, їх хімічної структури. Як біологічно-активні речовини рослинного походження, вони відрізняються меншою токсичністю порівняно з іншими класами сполук та великою поширеністю у природі у вигляді глікозидів. Флавоноли та ізофлаволи можна отримати із повсякденних харчових продуктів чи дієтичних добавок [7].

Основними дієтичними джерелами поліфенолів є фрукти та напої, овочі, сухі бобові та злакові культури. Біодоступність, період напіввиведення та екскреція поліфенольних сполук сильно коливається від

одного до іншого представника цієї групи. Ізофлавоноїди та галлові кислоти є найбільш добре засвоюваними, за ними слідує катехіни, флаванони, гесперидин і глікозиди кверцетину. Факторами, що призводять до поліпшеного засвоєння флавоноїдів, зокрема кверцетину та його метаболітів – є природа хімічної структури (прикріпленого цукру) та розчинність [8, 9].

Найменш засвоюються проантоціанідини, чайні катехіни і антоціани. Максимальна концентрація в плазмі рідко перевищує 1 мкМ після споживання 10-100 мг однієї фенольної сполуки. Однак, загальна концентрація фенольних сполук в плазмі вища через наявність метаболітів, що утворюються в тканинах організму або в товстому кишечнику мікрофлорою [9, 10].

Мета дослідження: вивчення кінетики інгібування гідролізу новокаїну похідними групи флавоноїдів з ціллю подовження дії активного фармацевтичного інгредієнту.

Матеріали і методи.

Для обґрунтування вибору цільового інгібітора проводились кінетичні дослідження швидкості гідролізу новокаїну бутирилхолінестеразою при додаванні гесперидину та кверцетину *in vitro*. В якості розчинника для важкорозчинних флавоноїдів, представлених у вигляді порошку, застосовувався диметилсульфоксид (ДМСО).

Проведення експериментальних вимірів здійснювалось за допомогою спектрофотометричного методу (УФ-спектрофотометр SPECORD 200, Analytic Jena, Німеччина) при довжині хвилі 290 нм протягом 30 хв з інтервалом 75 секунд. Вимір повторювали три рази для кожної концентрації флавоноїдів.

Як робочий розчин використовували суміш із фосфатного буферу (рН=7,6) 1400 мкл, розчину сироватки крові (Чехія, Erba Lachema s.r.o у вигляді ліофілізату) 50 мкл та розчину одного із перелічених флавоноїдів об'ємом 30 мкл. Далі інкубували протягом 5 хвилин при температурі 37 °С, після чого додавали розчин новокаїну 50 мкл. Загальний об'єм суміші що

вносили в кювету становив 1530 мкл. Як розчин порівняння використовували суміш, що складалась із фосфатного буферу (рН=7,6) 1480 мкл та розчину сироватки 50 мкл загальним об'ємом 1530 мкл.

Визначення швидкості розкладання новокаїну бутирилхолінестеразою у присутності флавоноїдів здійснювалось через розрахунок константи швидкості першого порядку (K_H^1) за формулою:

$$K_H^1 = \frac{1}{t} \times \ln \frac{D_\infty - D_0}{D_\infty - D_t}$$

де,

t – час у момент вимірювання;

D_∞ – максимальна оптична густина;

D_0 – оптична густина на початку вимірювання;

D_t – оптична густина у момент вимірювання.

Складання відповідних розрахунків, побудова графіків, діаграм та порівняння отриманих даних проводили в Microsoft Excel для Microsoft 365.

Результати та їх обговорення.

Результати вимірювання представлені у вигляді діаграм (рис. 1, 2) залежності величини константи швидкості першого порядку в присутності гесперидину та кверцетину, які прирівнюються до досліджуваної проби новокаїну без флавоноїдів.

Встановлено, що при введенні гесперидину в реакційну суміш відбувається зниження швидкості гідролізу новокаїну бутирилхолінестеразою (рис. 1). Константа швидкості першого порядку зменшилась від показника $1,39 \pm 0,01 \times 10^{-3}$ 1/с до $1,18 \pm 0,06 \times 10^{-3}$, 1/с при концентрації гесперидину 5 мкМ, що підтверджує інгібуючі властивості флавоноїду. При більших концентраціях гесперидину в розчині 25, 50 та 100 мкМ можна відслідкувати, що константа швидкості зменшилась у 1,4, 1,5 та 1,6 разів відповідно.

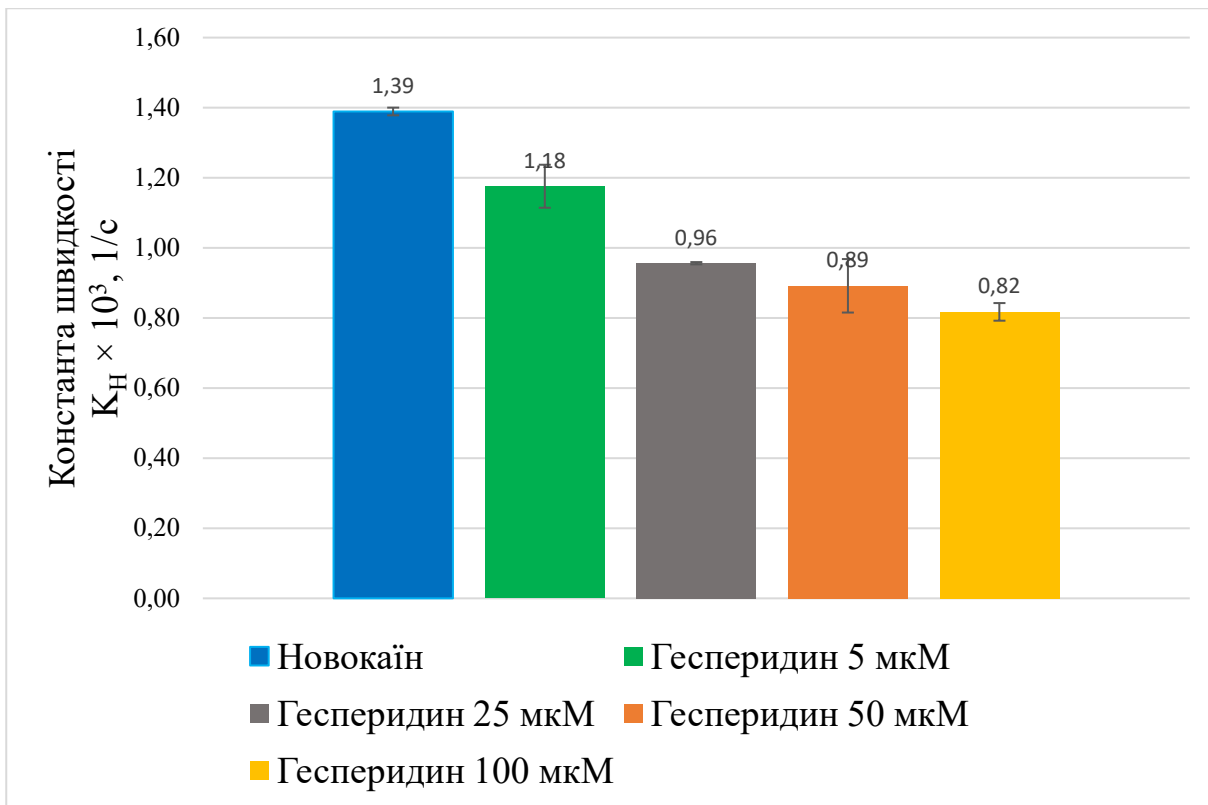


Рисунок 1. Залежність величини константи швидкості першого порядку розщеплення новокаїну в присутності гесперидину.

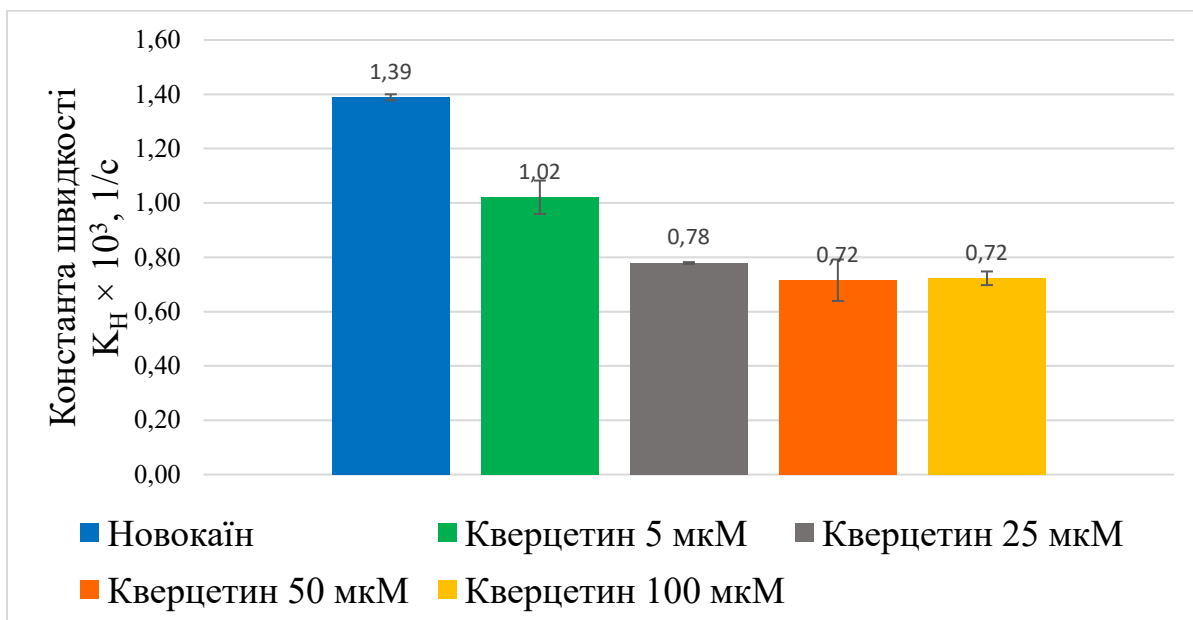


Рисунок 2. Залежність величини константи швидкості першого порядку розщеплення новокаїну в присутності кверцетину.

Показано, що така сама закономірність спостерігається і в присутності кверцетину. З рис. 2 видно, що найбільше інгібування спостерігалось при додаванні кверцетину у концентрації 50 та 100 мкМ.

При цьому константа швидкості розкладання новокаїну зменшилась у 2 рази (від $1,39 \pm 0,01 \times 10^{-3}$ 1/с до $0,72 \pm 0,06 \times 10^{-3}$, 1/с), що є менше середніх показників гесперидину при аналогічних концентраціях ($0,89 \pm 0,08 \times 10^{-3}$ 1/с та $0,82 \pm 0,03 \times 10^{-3}$ 1/с).

Висновки.

1. Встановлено, що зменшення швидкості реакції розщеплення новокаїну бутирилхолінестеразою сироватки крові людини відбувається при додаванні гесперидину та кверцетину в систему у концентраціях 5, 25, 50, 100 мкМ.
2. В результаті дослідження визначено ефективний інгібітор процесу гідролізу новокаїну – кверцетин, який можна розглядати як потенційний активний фармацевтичний інгредієнт лікарського засобу для місцевої анестезії пролонгованої дії.

Список літератури

1. Backonja, M. M. (1994). Local anesthetics as adjuvant analgesics. *Journal of pain and symptom management*, 9(8), 491–499. [https://doi.org/10.1016/0885-3924\(94\)90110-4](https://doi.org/10.1016/0885-3924(94)90110-4)
2. Ruetsch, Y. A., Böni, T., & Borgeat, A. (2001). From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs. *Current topics in medicinal chemistry*, 1(3), 175-182. <https://doi.org/10.2174/1568026013395335>
3. Ombregt, L. (2013). Procaine: Principles of treatment. *A System of Orthopaedic Medicine*. Science Direct, 83–115 e.5 <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3145-8.00005-3>

4. Lockridge, O. (2015). Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & therapeutics*, 148, 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.011>
5. Yuan, J., Yin, J., & Wang, E. (2007). Characterization of procaine metabolism as probe for the butyrylcholinesterase enzyme investigation by simultaneous determination of procaine and its metabolite using capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *Journal of chromatography. A*, 1154(1-2), 368–372. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.024>
6. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
7. Scholz, S., & Williamson, G. (2007). Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols in vivo. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition*, 77(3), 224–235. <https://doi.org/10.1024/0300-9831.77.3.224>
8. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), 230S–242S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.230S>
9. Kroon, P. A., Clifford, M. N., Crozier, A., Day, A. J., Donovan, J. L., Manach, C., & Williamson, G. (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro?. *The American journal of clinical nutrition*, 80(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.1.15>
10. Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8S Suppl), 2073S–85S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2073S>