

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ. МЕХАНІЗМИ ІНТОКСИКАЦІЙ

УДК 613.63,615.9; 615.252.349.7; 577.015.047+577.158

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ В СИСТЕМЕ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ СУКЦИНАМИДА

О.С. Лалыменко, М.Я. Кудря, кандидат биол. наук, И.В. Завгородний,* доктор мед.наук,
Н.В. Устенко, Н.В. Мельниковская, кандидат биол. наук

ГУ «Институт проблем эндокринной патологии
им. В. Я. Данилевского НАМН Украины», г. Харьков

* Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина

РЕЗЮМЕ. Цель. Определить приоритетные критерии влияния изучаемого сукцинамида в условиях интраназального поступления в организм экспериментальных животных.

Материалы и методы. Проведено 20-дневное интраназальное введение крысам субстанции сукцинатсодержащего антидиабетического средства в дозах 6, 7 и 1 мг/мл, что соответствует порогу острого (Lim_{ac}) и хронического (Lim_{ch}) ингаляционного действия. Исследовано состояние процессов: пероксидного окисления липидов по уровню диеновых конъюгатов, гидроперекисей липидов и активных продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, антиоксидантной защиты по активности глутатионзависимых ферментов, а также активности каталазы и супероксиддисмутазы.

Результаты и обсуждение. Установлено, что в крови животных происходит повышение активности каталазы сыворотки крови и глутатионпероксидазы гемолизата эритроцитов. В ткани печени, наоборот, отмечается некоторое ослабление ферментативной антипероксидной защиты в виде падения активности каталазы и глутатионпероксидазы, способствующее накоплению промежуточных продуктов липопероксидации в виде ГПЛ. Компенсаторное повышение активности глутатионтрансферазы в ткани печени стабилизирует процессы ПОЛ, что проявляется в снижении уровня конечных продуктов липопероксидации.

Выводы. Показатели ПОЛ и АОЗ (активность каталазы сыворотки крови, концентрация ТБКАС и ГПЛ гомогената печени, активность ГП, ГР гемолизата эритроцитов, Г-S-трансферазы гомогената печени) можно рассматривать как приоритетные критерии влияния сукцинатсодержащего антидиабетического средства при интраназальном поступлении в организм на уровне Lim_{ac} и Lim_{ch} .

Ключевые слова: антидиабетическое средство, сукцинамид, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита, биомаркеры эффекта.

Введение. Химико-фармацевтическая промышленность, как известно, является одной из материалоемких отраслей и по данным международной классификации Агентства по охране окружающей среды США относится к группе экологически опасных предприятий [1]. В связи с этим работа в условиях воздействия потенциально опасных соединений является фактором риска для здоровья работающего контингента и возникновения профессиональной патологии [2].

В современных условиях экономической нестабильности и ухудшения санитарно-эпидемиологического надзора за условиями труда в Украине снижается уровень производственной безопасности, в том числе и в фармацевтической отрасли [3].

На химико-фармацевтических предприятиях при синтезе и изготовлении готовых лекарственных средств (ЛС) одно-

моментно могут присутствовать в воздухе рабочей зоны различные по характеру действия органические и неорганические вещества, способные оказывать комбинированное действие на организм работающих [4]. Химические вещества, в том числе и ЛС, могут поступать в организм работающих через неповрежденные кожные покровы, слизистые оболочки, органы пищеварения. Однако основной и наиболее агрессивный путь попадания в организм ЛС в условиях производства – через дыхательные пути [5].

Выбранное для исследования сукцинатсодержащее антидиабетическое средство β - фенилэтиламид 2-оксисукцинаниловой кислоты – β -ФЭА-ОСАК, синтезированное в ГУ «Институт проблем эндокринной патологии НАМН Украины» (г.Харьков), помимо антигипергликемического и антиоксидантного эффекта способно оказы-

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ. МЕХАНІЗМИ ІНТОКСИКАЦІЙ

вать стимулирующее действие на регенерацию и секреторную функцию панкреатических β -клеток, препятствуя их деструкции диабетогенными факторами, снижает риск развития диабетических микро- и макроангиопатий в условиях относительной или абсолютной инсулиновой недостаточности [6]. В настоящее время на одном из отечественных предприятий планируется его промышленный выпуск, поэтому всестороннее исследование его влияния на здоровый организм является актуальным.

Одна из приоритетных задач современной профилактической медицины — интенсивный поиск объективных, чувствительных и информативных ранних маркеров нарушений в состоянии здоровья работающих, отражающих перестройки в основных звеньях метаболических превращений в условиях производственного воздействия химических факторов [7].

Исследованиями последних лет установлено, что окислительно-восстановительные процессы, главным образом, баланс между образованием свободных радикалов и механизмами антиоксидантной защиты во многом определяет стабильность гомеостаза живого организма [8].

Воздействие на организм работающих химических факторов, в том числе ЛС в условиях их промышленного выпуска, может способствовать активации эндогенных механизмов свободнорадикального окисления и приводить к напряжению в системе антиоксидантной защиты с последующим развитием окислительного стресса. Во многих публикациях, посвященных поиску критериев ранней и специфической донозологической диагностики профессиональной патологии, инициированной ЛС, отводится первостепенная роль именно состоянию проантиоксидантного гомеостаза, как пускового механизма развития патологии различного генеза [9].

Цель. Определить приоритетные критерии влияния изучаемого сукцинамида в условиях интраназального поступления в организм экспериментальных животных.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 30 половозрелых, нелинейных крысах-самцах массой тела 200-260 г, содержащихся в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов

на животных» (Украина, 2001) [10]. Проведено 20-дневное интраназальное моделирование ингаляционного пути введения: животным вводили водную эмульсию субстанции β -ФЭА-ОСАК с твин-80 в дозах 6,7 и 1 мг/мл, что в перерасчете соответствует порогу острого (Lim_{ac}) и хронического (Lim_{ch}) ингаляционного действия [11]. Контрольная группа животных получала интраназально стерильный физиологический раствор в количестве 0,3 мл/кг. Для проведения биохимических исследований получали биосубстрат: кровь, плазму крови, сыворотку крови, ткань печени.

Процессы свободнорадикального пероксидного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию диеновых конъюгатов (ДК), гидроперекисей липидов (ГПЛ) и активных продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКАС), в сыворотке крови, цельной крови и гомогенате печени [12-14]; антиоксидантный статус организма животных изучали, исходя из активности глутатионзависимых ферментов — глутатионредуктазы (ГР) (КФ 1.6.4.2), глутатионпероксидазы (ГП) (КФ 1.11.1.9), глутатионтрансферазы (ГТ) (КФ 2.5.1.18) в гемолизате эритроцитов и гомогенате печени [15]. Кроме этого, определяли каталазную активность (КФ 1.11.1.6) сыворотки крови и гомогената печени, активность супероксиддисмутазы (СОД) (КФ 1.15.1.1) в гомогенате печени [16-17]. В качестве вспомогательных характеристик для расчета активности ферментов в гемолизате эритроцитов определяли концентрацию общего гемоглобина [18].

Нормальность распределения в рядах определяли по критерию Шапиро-Уилка (W). Для парного сравнения показателей подопытной группы с интактным контролем использовали критерий Стьюдента. Фактический материал обрабатывали с помощью пакета программного обеспечения StatSoft 10 [19].

Результаты и обсуждение. Анализируя показатели системы пероксидного окисления липидов в условиях интраназального поступления субстанции β -ФЭА-ОСАК в дозе 6,7 мг/мл, соответствующей Lim_{ac} , в сыворотке крови подопытных животных по сравнению с контролем выявлена активация только первичных реакций ПОЛ в

**ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ.
МЕХАНІЗМИ ІНТОКСИКАЦІЙ**

виде ДК при отсутствии изменений интенсивности других окислительных реакций каскадного процесса (табл.).

Следует отметить, что при введении данной дозы исследуемого соединения отсутствовали изменения в содержании промежуточных и конечных продуктов ПОЛ в крови, что, по-видимому, связано с активацией каталазы сыворотки крови ($p < 0,05$) и ГП гемолизата эритроцитов ($0,05 < p < 0,1$) у этой группы животных. Данные энзимы первой и второй линии антиоксидантной защиты препятствуют накоплению в клетках гидроперекисей и тем самым блокируют развитие цепной реакции с образованием высокотоксичных гидроксильных радикалов. Известно, что каталаза является ферментом преимущественно первого уровня антиоксидантной защиты и наиболее активна при высоких концентрациях пероксидов. Для дальнейшей инактивации активированных кислородных метаболитов при малых количе-

ствах гидроперекиси более эффективна окислительно-восстановительная ферментативная система глутатиона, в частности глутатионпероксидаза, которая катализирует разложение перекисей путем окисления [20]. Вместе с тем в группе животных, получавших интраназально β -ФЭА-ОСАК в дозе 1 мг/мл, наоборот, отмечали изолированное снижение активности ГР гемолизата эритроцитов ($p < 0,05$), что, возможно, связано с напряжением антиокислительных процессов в системе рециклирования глутатиона и определенными перестройками в процессах конъюгации и элиминации в ответ на поступление исследуемого соединения [8].

Обращает на себя внимание более выраженная реакция печени на интраназальное введение соединения. Так, при данных условиях эксперимента в ткани печени подопытных животных на уровне обеих доз зарегистрировано ускорение скорости накопления промежуточных составляю-

Таблица

Некоторые показатели липопероксидации и антиоксидантной защиты у крыс в условиях интраназального введения антидиабетического средства, ($X \pm Sx$)

Показатель	n	Контроль	n	β -ФЭА-ОСАК 1 мг/мл	n	β -ФЭА-ОСАК 6,7 мг/мл
Диеновые конъюгаты: – сыворотка, мкмоль/л – печень, мкмоль/г тк.	8 10	0,38 \pm 0,02 45,3 \pm 2,1	8 10	0,42 \pm 0,02 47,2 \pm 1,7	8 10	0,5 \pm 0,03 ¹⁾ 45,3 \pm 2,2
Гидроперекиси липидов: – сыворотка, мкмоль/л – печень, мкмоль/г тк.	8 9	4,0 \pm 0,3 70,2 \pm 3,7	7 10	3,4 \pm 0,3 103,3 \pm 6,5 ¹⁾	8 10	4,1 \pm 0,2 87,5 \pm 8,1 ²⁾
ТБКАС: – кровь, мкмоль/мл – печень, мкмоль/г	10 9	0,65 \pm 0,04 51,4 \pm 1,1	10 10	0,57 \pm 0,03 52,4 \pm 2,2	8 10	0,56 \pm 0,02 47,3 \pm 1,3 ¹⁾
Активность каталазы: – сыворотка, мкат H ₂ O ₂ /л – печень, мкат H ₂ O ₂ /г тк./мин	8 8	1,9 \pm 0,08 42,3 \pm 0,6	8 8	2,2 \pm 0,13 35,1 \pm 0,6 ¹⁾	7 9	2,2 \pm 0,08 ¹⁾ 37,6 \pm 0,4 ¹⁾
Глутатионредуктаза эритроцитов, мкмоль НАДФН/г Hb \times мин	10	3,7 \pm 0,4	8	1,3 \pm 0,2 ¹⁾	9	2,9 \pm 0,3
Глутатионпероксидаза эритроцитов, мкмоль GSSG ⁴⁾ /г Hb \times мин.	10	110,4 \pm 10,9	10	90,0 \pm 11,4	10	150,5 \pm 19,5 ²⁾
Глутатионпероксидаза печени, мм/г тк./мин	6	35,4 \pm 6,6	7	17,5 \pm 1,5 ¹⁾	7	16,4 \pm 1,5 ¹⁾
Глутатион-S-трансфераза печени, нмоль GS-ДНБ ⁴⁾ /мг протеина \times мин.	10	24,7 \pm 2,5	10	31,4 \pm 2,5 ²⁾	10	34,3 \pm 1,2 ¹⁾

Примечания: 1) отклонение статистически достоверно, ($p < 0,05$); 2) отклонение статистически близко к достоверному, ($0,05 < p < 0,1$); 3) – GSSG – глутатион окисленный; 4) – комплекс GS – 2,4-динитробензол.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ. МЕХАНІЗМИ ІНТОКСИКАЦІЙ

щих пероксидного окисления, в частности, повышение уровней ГПЛ с различным уровнем статистической значимости по сравнению с контролем. Значительное повышение уровня ГПЛ, вероятно, связано с выявленным у подопытной группы животных (доза 1 мг/мл) при данных условиях экспозиции снижением активности каталазы и ГП в гомогенате печени ($p < 0,05$). При этом на конечных стадиях интенсивность липопероксидации в печени животных замедлялась, о чем свидетельствует снижение уровня конечных продуктов деградации жирных кислот ТБКАС ($p < 0,05$) в группе животных, получавших интраназально β -ФЭА-ОСАК в дозе 6,7 мг/мл. у животных, получавших меньшую дозу, данный показатель находился на уровне контрольных значений.

Вместе с этим в гомогенате печени у подопытных животных на обоих уровнях доз отмечено существенное повышение активности глутатион-S-трансферазы. Основная функция данного фермента – защита клеток от неблагоприятного воздействия ксенобиотиков и продуктов ПОЛ посредством их восстановления, присоединения к субстрату молекулы глутатиона (конъюгации) или нуклеофильного замещения гидрофобных групп. Следовательно, при ослаблении активности отдельных изоферментов глутатионового ряда именно ГТ способствует нейтрализации и ускорению выведения из организма нарастаю-

щего содержания продуктов липопероксидации [21]. В данном случае, скорее всего, имеет место компенсаторное повышение активности ГТ в гомогенате печени в ответ на резкое снижение активности ГП и каталазы, направленное на сохранение проантиоксидантного баланса.

Установлено, что при моделировании ингаляционного пути поступления сукцинамида в виде интраназального введения в дозах 6,7 и 1 мг/мл в системе крови происходит активация ферментов антипероксидной защиты, что способствует блокировке каскадных реакций ПОЛ, о чем свидетельствует отсутствие изменений уровня промежуточных и конечных продуктов окислительной деградации жирных кислот в крови. В ткани печени животных снижается антиперекисная защита (падение активностей каталазы и ГП) и компенсаторно повышается активность ГТ, что, в свою очередь, приводит к замедлению и стабилизации накопления конечных продуктов ПОЛ.

Выводы. Таким образом, показатели ПОЛ и АОЗ (активность каталазы сыворотки крови, концентрация ТБКАС и ГПЛ гомогената печени, активность ГП, ГР гемолизата эритроцитов, ГТ гомогената печени) можно рассматривать как приоритетные критерии влияния β -ФЭА-ОСАК при интраназальном поступлении в организм на уровне Lim_{ac} и Lim_{ch} .

ЛИТЕРАТУРА

1. Буров Ю. И. Проблемы экологической безопасности человека в химико-фармацевтической промышленности / Ю. И. Буров – М.: Медицина. 1995. – 365 с.
2. Кундиев Ю. И. Химическая опасность в Украине и меры по ее предупреждению / Ю. И. Кундиев, И. М. Трахтенберг // Журнал АМН Украины. – 2004. – № 2. – С. 259–267.
3. Александрова Л. Г. До проблеми гігієнічного контролю за забрудненням виробничого середовища хімічними речовинами / Л. Г. Александрова // Укр. журнал з пробл. медицини праці. – 2011. – № 1. – С. 71–81.
4. Тарасова Н. И. Методические и методологические проблемы охраны труда и промышленной безопасности / Н. И. Тарасова, В. И. Козлов // Вестник Кузбасского государственного технического университета. – 2012. – № 3(91). – С. 120–124.
5. Малютин Н. Н. Патологические и клинические аспекты воздействия метанола и формальдегида на организм человека / Л. А. Тараненко // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2. – С. 1–11.
6. Горбенко Н. І. Патогенетичне обґрунтування ефектності похідного янтарної кислоти – фенсукциналу в терапії цукрового діабету та його судинних ускладнень (експериментальне дослідження) : автореф. дис. ... на здобуття наук. ступеня д-ра біол. наук: спец. 14.01.14 / Горбенко Наталія Іванівна. – Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського АМН України. – Х., 2004. – 36 с.
7. Измеров Н. Ф. Охрана здоровья рабочих и профилактика профессиональных заболеваний на современном этапе / Н. Ф. Измеров // Медицина труда и промышленная экология. – 2002. – № 1. – С. 1–7.
8. Чеснокова Н. П. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах / Н. П. Чеснокова, Е. В. Понукалина, Н. М. Бизенкова // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 7. – С. 29–36.
9. Изучение окислительного метаболизма в профпатологии (обзор литературы) / В. А. Кириянов [и др.] // Медицина труда и пром. экология. – 2004. – № 4. – С. 22–26.
10. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142 – 145.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ. МЕХАНІЗМИ ІНТОКСИКАЦІЙ

11. МВ 1.1.5-121-2005 Методичні вказівки з обґрунтування ГДК лікарських засобів у повітрі робочої зони і атмосферному повітрі населених місць // МОЗ України; Державна санітарно-епідеміологічна служба. — Київ. — 2005. — 30 с.
12. Плацер З. Определение диеновых конъюгатов и общих гидроперекисей в биологических материалах / З. Плацер, М. Видлакова, Л. Купила // Чехосл. мед. обзор. — 1970. — Т. 16, № 1. — С. 30 — 34.
13. Asakawa T. Colorings conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides / T. Asakawa, S. Matsushite // Lipids. — 1980. — Vol. 15. — P.137- 140.
14. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Соврем. методы в биохимии. — М.: Медицина. — 1977. — С. 66 — 68.
15. Арутюнян А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма : метод. рекомендации / Рос. акад. мед. наук; авт. А.В. Арутюнян [и др.]. — СПб., 2000. — С. 76.
16. Мишенева В.С. Наличие глутатиона в нормальных и опухолевых тканях человека и животных / В. С. Мишенева, Т. А. Горюхина // Вопр. онкологии. — 1968. — Т. 14, № 10. — С. 46 — 49.
17. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Маёрова, В.Е. Токарев // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16 — 19.
18. Методы качественного и количественного спектрофотометрического анализа гемоглобина и его дериватов в эритроцитах и плазме крови / М. С. Кушаковский // Клинические формы повреждения гемоглобина. — Л., 1968. — С. 9 — 80.
19. Пакет программного обеспечения для статистического анализа StatSoft Statistic 10.0.
20. Горожанская Э.Г. Свободнорадикальное окисление и механизмы антиоксидантной защиты в нормальной клетке и при опухолевых заболеваниях / Э.Г. Горожанская // Клиническая лабораторная диагностика. — 2010. — № 6. — С. 20—44.
21. Землянова М.А. Современные подходы к оценке нарушений метаболизма ксенобиотиков при поступлении в организм из внешней среды / М. А. Землянова, Ю. В. Кольдибекова // Экология человека. — 2012. — № 8. — С. 8—14.

ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН У СИСТЕМІ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ ТА АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В УМОВАХ ІНТРАНАЗАЛЬНОЇ ДІЇ СУКЦИНАМІДУ

О. С. Лалименко, М. Я. Кудря, І. В. Завгородній, Н. В. Устенко, Н. В. Мельниківська

РЕЗЮМЕ. Мета. Визначити пріоритетні критерії впливу сукцинамиду за умов інтраназального надходження до організму експериментальних тварин.

Матеріали та методи. Проведено 20-денне інтраназальне введення сукцинатвмісного антидіабетичного засобу шурам у дозах 6,7 та 1 мг/мл, що відповідає порозу гострої (Lim_{gc}) та хронічної (Lim_{ch}) інгаляційної дії. Досліджено стан процесів: пероксидного окиснення ліпідів за рівнем дієнових кон'югатів, гідроперекисей ліпідів та активних сполук, що реагують з тиобарбітуровою кислотою, антиоксидантного захисту за активністю глутатіонзалежних ферментів, а також активності каталази та супероксиддисмутаз.

Результати та обговорення. Встановлено, що в крові тварин відбувається підвищення активності каталази сироватки крові та глутатіонпероксидази гемолізату еритроцитів. У тканині печінки, навпаки, відзначали деяке послаблення ферментативного антипероксидного захисту у вигляді падіння активності каталази та глутатіонпероксидази, яке сприяє накопиченню проміжних продуктів ліпопероксидації у вигляді ГПЛ. Компенсаторне підвищення активності глутатіон-трансферази в тканині печінки стабілізує процеси ПОЛ, що сприяє зниженню рівня кінцевих продуктів ліпопероксидації.

Висновки. Показники ПОЛ та АОЗ (активність каталази сироватки крові, концентрація ТБКАС і ГПЛ гомогенату печінки, активність ГП, ГР гемолізату еритроцитів, Г-S-трансферази гомогенату печінки) можна розглядати як пріоритетні критерії впливу сукцинатвмісного антидіабетичного засобу при інтраназальному надходженні до організму на рівнях Lim_{ac} и Lim_{ch} .

Ключові слова: антидіабетичний засіб, перекисне окиснення ліпідів, антиоксидантний захист, біомаркери ефекту.

PECULIARITIES OF CHANGES IN SYSTEM OF LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT PROTECTION BY INTRANASAL IMPACT OF SUCCINAMIDE

O.Lalimenko, M. Kudria, I. Zavgorodnii, N. Ustenko, N. Melnikivska

SUMMARY. Objective. To determine priority criteria of influence of succinamide under intranasal exposure on experimental animals.

Materials and methods. It was carried out that 20-day intranasal injection in rats of antidiabetic agent succinic acid derivative at doses of 6,7 and 1 mg/ml corresponds to the threshold of acute and chronic inhalation action. It was research of the processes state of lipid peroxide oxidation investigated by the level of diene conjugates, by lipid hydroperoxide and active products that react with thiobarbituric acid, antioxidant protection by enzymes glutathione activity, as well as the activity of catalase and superoxide dismutase.

Results. It was established that in blood of animals there is an increase catalase of serum and glutathione peroxidase active of erythrocytes hemolysate. In the liver tissue, on the contrary, there has been some weakening of the enzymatic antiperoxidant protection: reducing the activity of catalase and glutathione peroxidase, and this contributes to the accumulation of intermediate products of lipid peroxidation – lipid hydroperoxides. Compensatory increase in glutathione transferases activity in the liver tissue, stabilizes the lipid peroxidation processes, which manifests itself in reducing finite level products of lipid peroxidation.

Conclusion. Indicators of lipid peroxidation and antioxidant protection (catalase activity of serum, concentrations of active products that react with thiobarbituric acid and lipid hydroperoxides liver homogenate, glutathione peroxidase activity, glutathione reductase of hemolysate erythrocytes, glutathione transferase of liver homogenate) can be considered as priority criteria influence of antidiabetic agent succinic acid derivative by intranasal the body is at Lim_{ac} and Lim_{ch} .

Key words: antidiabetic drug, lipid peroxide oxidation, antioxidant protection, biomarkers of effect.

Надійшла до редакції 10.07.2016 р.