УДК: 615.252.349.099+613.632

ВИЗНАЧЕННЯ КРИТЕРІЇВ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ ДЕЯКИХ АНТИДІАБЕТИЧНИХ ЗАСОБІВ ДЛЯ ЇХ ГІГІЄНІЧНОГО РЕГЛАМЕНТУВАННЯ

Палагіна І.А., Кудря М.Я., Колодуб Ф.А., Карпенко Н.О., Козар В.В., Кавок Н.С., Устенко Н.В.

Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я.Данилевського АМН України, м. Харків

У динаміці інгаляційної експозиції досліджено вплив антидіабетичних засобів фенсукциналу та діакамфу на стан цілісного організму, окремих його органів та систем з урахуванням змін інтегральних, функціональних, метаболічних та імунологічних показників у щурів. Визначено критерії інгаляційної токсичності цих лікарських засобів, якими є порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу та стану неспецифічної резистентності. Ці критерії рекомендовано для встановлення порогових концентрацій та гігієнічного регламентування антидіабетичних сполук з антиоксидантною активністю.

Ключові слова: антидіабетичні засоби, інгаляційна експозиція, критерії токсичності, прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз, неспецифічна резистентність, гігієнічне регламентування

Вступ

Лікарські засоби, що належать до біологічно активних речовин зі специфічними властивостями, в умовах промислового виробництва є потенційно небезпечними для здоров'я працівників. Залежно від дози/концентрації та часу експозиції вони можуть викликати в організмі різні функціональні та метаболічні порушення, що супроводжуються напруженням механізмів детоксикації, або навіть розвиток патологічних процесів зі специфічними ознаками інтоксикації. Для обмеження контакту з цими потенційно токсичними речовинами на виробництві для них розробляються гігієнічні регламенти у повітряному середовищі на підставі оцінки/прогнозування ризику їхньої токсичної дії з обґрунтуванням мінімально діючих і безпечних для здоров'я працюючих величин.

Сучасні методичні підходи експериментальної токсикології до гігієнічного регламентування лікарських засобів у повітрі робочої зони принципово не відрізняються від загальної методології встановлення гігієнічних регламентів шкідливих речовин. Проте вони мають деякі особливості, зумовлені як специфічними видами активності цієї групи ксенобіотиків, так і умовами їх промислового виробництва [1].

Для виявлення ранніх ознак ушкоджуючої дії нових лікарських засобів важливе значення має вибір адекватних методів дослідження, що базується на первинних даних щодо їх токсичності та даних про діапазон біологічних ефектів, особливості токсикокінетики та токсикодинаміки, метаболізму та механізмів дії відомих лікарських засобів певних фармакологічних груп. Дослідження біомаркерів стану функціонально-метаболічних систем, що беруть участь у формуванні процесу адаптації до дії окремих груп лікарських засобів, є основою для розробки критеріїв ризику їхньої шкідливої дії, що дозволяє розмежувати адаптаційні, компенсаторно-пристосувальні реакції або патологічний стан організму. Це надає одну з реальних можливостей для вдосконалення методичних підходів до обґрунтування гігієнічних регламентів для лікарських засобів різних фармакологічних груп [2].

Відомо, що ключову роль у реалізації токсичної дії більшості ксенобіотиків на біологічні системи відіграє оксидативний стрес, за якого генерація активних форм кисню та інших вільнорадикальних метаболітів переважає їхню елімінацію системами антирадикального та антиоксидантного захисту (АРЗ, АОЗ). Утворення надлишку високореакційних вільнорадикальних продуктів та послаблення АРЗ та АОЗ призводить до надмірної активації реакцій пероксидної модифікації біомолекул — ліпідів, білків та нуклеїнових кислот. Наслідками цього є порушення структурної цілісності біомембран, кінетичних властивостей ферментів і надмолекулярних субклітинних комплексів та дезорганізація різних метаболічних процесів. Отже, розбалансування процесів вільнорадикального пероксидного окислення (ВРПО), АРЗ та АОЗ є однією з ключових ланок розвитку різних патологічних процесів в організмі [3].

Крім оксидативних процесів, до формування ранніх токсичних ефектів ксенобіотиків, у тому числі й лікарських засобів, можуть залучатися певні

імунні механізми. Тому для пошуку критеріїв ушкоджуючого впливу лікарських засобів на організм актуальними є також дослідження змін імунних процесів, зокрема неспецифічної імунної відповіді організму як першої реакції на токсичний вплив хімічних сполук.

Враховуючи роль порушень ВРПО, АРЗ та АОЗ, а також стану неспецифічної резистентності у виникненні та подальшому розвитку токсичних ефектів, їх аналіз у порівнянні з порушеннями основних видів метаболізму та загальнотоксичними ефектами має важливе значення для з'ясування ранніх механізмів ушкоджуючої дії лікарських засобів та визначення критеріїв оцінки/прогнозування їх токсичності.

Токсикологічні дослідження впливу антидіабетичних засобів фенсукциналу (β-фенілетиламід 2-оксисукцинанілової кислоти) та діакамфу (цис-3-(2'бензімідазоліл)-1,2,2-триметилциклопентанкарбонова кислота) на біохімічний та імунний статус щурів у динаміці інгаляційної експозиції раніше не проводились. Це — оригінальні лікарські засоби з антигіперглікемічною та антиоксидантною активністю, що впливають на ключові патогенетичні ланки цукрового діабету на ранніх стадіях його розвитку і знижують ризик судинних ускладнень захворювання. Встановлено, що одним з молекулярних механізмів їхньої антидіабетичної дії є пригнічення оксидативного стресу у поєднанні з активацією біоенергетичних процесів [4, 5]. У зв'язку з цим можна припустити, що одним з пускових механізмів токсичного ушкодження організму за впливу антидіабетичних засобів може бути порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу внаслідок дестабілізації ВРПО.

Мета роботи — з'ясування особливостей впливу антидіабетичних засобів фенсукцинал та діакамф на функціонально-метаболічний та імунний статус щурів-самців за умов інгаляційної експозиції та визначення критеріїв токсичності для їх гігієнічного регламентування.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження виконано на 160 статевозрілих білих щурах-самцях лінії Вістар з вихідною масою тіла 180—200 г. Тварин утримували в стандартних умовах віварію на повноцінному харчовому раціоні з вільним доступом до води. Дослідження проводилися відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001). Інгаляційне затравлення тварин аерозолями лікарських засобів здійснювали у типових пилових камерах системи Боярчука. Тривалість інгаляції фенсукциналом — два, а діакамфом — три місяці за умов щоденної чотиригодинної експозиції (п'ять разів на тиждень) у концентраціях 1,51±0,38 мг/м^3 та 3,50±0,08 мг/м^3 відповідно. Ці концентрації близькі до розрахункових величин порогу хронічної дії (Lim_{ch}), що становлять для фенсукциналу 2,63 мг/м^3, а для діакамфу — 3,62 мг/м^3. Кількість щурів у кожній дослідній та контрольній групі дорівнювала 10. Після закінчення експериментів тварин знеживлювали декапітацією під ефірним наркозом.

Мікросомальну фракцію печінки одержували методом диференціального центрифугування, гомогенат легенів — шляхом подрібнення та розтиранням органу зі склом. Стан ВРПО, АРЗ та АОЗ у мікросомах печінки та гомогенаті легенів оцінювали за інтенсивністю спонтанної хемілюмінесценції (СХЛ), амплітудою швидкого спалаху та світлосумою хемілюмінесценції (за 6 хвилин), що ініціюється Fe^{2+} та H_2O_2 (Fe^{2+}-ХЛ, H_2O_2-ХЛ) [6]. Вміст білка у пробах визначали за методом М.Бредфорда [7]. У гомогенаті печінки та легенів, сироватці та цільній крові визначали вміст дієнових кон'югатів (ДК) [8], сполук, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБКАС) [9], основ Шіффа [10], відновленого глутатіону [11] та вітаміну Е [12], активність ферментів каталази [13] та супероксиддисмутази (СОД) [14].

Для характеристики стану вуглеводного обміну досліджували вміст глюкози в крові за допомогою аналізатора глюкози «Ексан-Г» та вміст глікогену у гомогенаті печінки. Для оцінки стану ліпідного обміну застосовували низку біохімічних показників: рівень загальних ліпідів, β-ліпопротеїнів, холестерину, тригліцеридів та фосфоліпідів, які визначали за допомогою стандартних наборів фірми «Pliva-Lachema» (Чехія) та «Sentinel CH» (Італія). Стан білкового обміну оцінювали за рівнем загального білка, протеїнограмами та тимоловою пробою. У сироватці крові визначали активності аланінамінотрансферази (АлАТ) та аспартатамінотрансферази (АсАТ), вміст сечовини та хлоридів з використанням стандартних тест-наборів фірми «Pliva-Lachema» (Чехія).

Стан неспецифічної резистентності організму оцінювали за показниками фагоцитарної активності нейтрофілів [15], їх бактерицидним ефектом (окисно-відновний потенціал) у тесті відновлення нітросинього тетразолію [16] та рівнем гетерофільних аглютинінів у реакції Пауля-Буннелля [17].

Інтегральна оцінка функціонального стану цілісного організму включала визначення маси тіла, відносної маси внутрішніх органів, гемограми з дослідженням рівня окисленого гемоглобіну та метгемоглобіну, показників коагулограми та інтегральних показників стану ЦНС. Показники визначали в динаміці: через 15 діб, один, два або три місяці інгаляційної експозиції та через місяць по закінченні інгаляції (період післядії).

Статистичну обробку даних проводили методами варіаційної статистики за допомогою стандартного пакету програм Excel-2003. Для порівняння двох рядів з нормальним розподілом застосовували класичний t-критерій Ст'юдента та модифікований критерій з роздільними оцінками дисперсій. Розходження вважали вірогідними при $P<0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення

За даними наших попередніх досліджень [18, 19], антидіабетичні засоби фенсукцинал та діакамф за критерієм $ЛД_{50}$, який визначали при пероральному та внутрішньоочеревинному введенні щурам та мишам, відповідають практично нетоксичним речовинам (V клас токсичності за класифікацією К.К.Сидорова, 1973), не мають здатності до кумуляції в організмі, не чинять місцевої подразнюючої дії на шкіру і слизові оболонки очей. Для діакамфу є характерною шкірно-резорбтивна дія з ознаками несприятливого впливу на стан периферичної крові, функціонально-метаболічний стан печінки та у вигляді збільшення відносної маси печінки та нирок. Доведено, що фенсукцинал та діакамф не виявляють мутагенної дії на соматичні та статеві клітини щурів (одноразові дози *per os* – 5000 і 1000 мг/кг відповідно), а фенсукцинал (*per os* 25 мг/кг) – ембріотоксичної та тератогенної дій. За умов внутрішньошкірної сенсибілізації морських свинок фенсукциналом (25 і 250 мкг/кг) та діакамфом (50 і 200 мкг/кг) та комбінованої з 7-разовими епікутанними аплікаціями сполуки не викликають алергічні реакції негайного та сповільненого типів. За умов субхронічного перорального введення фенсукцинал (5000 мг/кг) викликає підвищення в сироватці крові рівня загального білка, діакамф (1000 мг/кг) – рівня холестерину у поєднанні з підвищенням відносної маси печінки щурів. Це свідчить про причетність саме печінки до первинних відповідей організму на введення цих похідних дикарбонових кислот. За впливу фенсукциналу також зареєстровано підвищення відносної маси надниркових та передміхурової залоз [18, 19].

Також доведено [20], що досліджені лікарські засоби за цих же умов експозиції у зазначених дозах здатні стимулювати в мікросомах печінки щурів процеси ВРПО з утворенням надлишку метаболітів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та гальмуванням їх подальшого окислення, що за впливу фенсукциналу супроводжується активацією монооксигеназної системи та послабленням АОЗ. Такої спрямованості порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу спостерігаються при застосуванні фенсукциналу навіть в дозах, що в 10–50 разів нижчі за діючі за загальнотоксичними показниками.

Поріг гострої дії (Lim_{ac}) фенсукциналу встановлено на рівні 27,9 мг/м^3 за інтенсифікацією процесу ПОЛ, пригніченням АОЗ та накопиченням атерогенних фракцій ліпопротеїнів, діакамфу – 67 мг/м^3 за впливом на стан ПОЛ та пригніченням функціонального стану ЦНС. Активація процесів ВРПО та пригнічення АРЗ у мікросомах печінки та крові щурів спостерігається і за умов субхронічної експозиції фенсукциналом у концентрації 20,2±1,4 мг/м^3, близькій до Lim_{ac}. З цими ефектами, очевидно, пов'язані зміни деяких ланок вуглеводного (зниження вмісту глюкози в крові) та ліпідного метаболізму (підвищення вмісту холестерину та β-ліпопротеїнів у сироватці крові) в організмі щурів.

Для гігієнічного регламентування фенсукциналу та діакамфу в наших подальших дослідженнях з'ясовано особливості змін функціонально-метаболічного стану організму, окремих його органів та систем з урахуванням можливих порушень прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу та стану неспецифічної резистентності за умов тривалої (2 та 3 місяці) інгаляції в концентраціях, що є близькими до прогнозованих величин Lim_{ch}.

Аналіз стану процесів ВРПО, систем АРЗ та АОЗ в умовах надходження фенсукциналу в концентрації 1,51±0,38 мг/м^3 показав, що після 15 днів та місяця інгаляції не зареєстровано змін їх основних параметрів у мікросомальній фракції та гомогенаті печінки, сироватці та цільній крові щурів. Лише у гомогенаті легенів після місяця інгаляції спостерігається вірогідне підвищення активності каталази (від 6,2±0,3 мкат/л у контролі до 7,8±0,5 мкат/л у досліді; $P<0,05$), що, вірогідно, запобігає акумуляції надмірної кількості пероксиду водню. На відміну від фенсукциналу, за умов 15-денного впливу діакамфу в концентрації 3,5±0,08 мг/м^3 у мікросомальній фракції печінки щурів вірогідно зростає у 2,0 та 4,9 раза інтенсивність СХЛ та амплітуда швидкого спалаху Fe^{2+}-ХЛ (з 5±2 у контролі до

10±2 імп./с на 1 мг білка у досліді та з 9±3 у контролі до 44±10 імп./с на 1 мг білка у досліді, відповідно), у гомогенаті легенів — значення цих параметрів хемілюмінесценції, навпаки, вірогідно знижуються у 1,5 та 2,7 рази відповідно (до 4±1 у досліді при 6±1 імп./с на 1 мг білка у контролі та до 6±1 у досліді при 16±4 імп./с на 1 мг білка у контролі; P<0,05). Ці зміни свідчать про те, що діакамф за умов відносно короткочасної інгаляційної експозиції викликає у мікросомах печінки активацію процесів ВРПО, у тому числі значну інтенсифікацію ПОЛ, а у тканині легенів — їхнє уповільнення, ознакою якого є вірогідне зниження інтенсивності швидкого спалаху Fe^{2+}-ХЛ, яка, як відомо, корелює із вмістом гідроперекисів ліпідів. На цьому фоні дещо несподіваним є зареєстроване зниження вмісту вітаміну Е у гомогенаті легенів (до 0,28±0,16 у досліді при 1,03±0,24 нмоль/мг білка у контролі; P<0,05). Проте не можна виключити, що зниження рівня цього антиоксиданта є наслідком його підсиленого використання тканиною легенів для утилізації гідроперекисів ліпідів, завдяки чому їх вміст у цій тканині вірогідно знижується.

Через один місяць інгаляції діакамфом не зареєстровано змін жодного хемілюмінесцентного параметра стану ВРПО, АРЗ та АОЗ у всіх біосубстратах, що досліджувались, проте серед біохімічних показників ПОЛ відмічено вірогідне зниження у 1,3 рази вмісту ТБКАС у гомогенаті легенів (від 72,0±6,05 у контролі до 56,0±3,5 мкмоль/г у досліді; P<0,05), що є ознакою зниження інтенсивності процесу ПОЛ на його кінцевій стадії.

За умов більш тривалої експозиції (2 або 3 місяці) у мікросомах печінки зареєстровано зміни хемілюмінесцентних параметрів ВРПО, ПОЛ, АРЗ та АОЗ: зниження амплітуди швидкого спалаху Fe^{2+}-ХЛ у 2 (P<0,05) та 1,7 раза (0,05<P<0,1) за впливу фенсукциналу та діакамфу, і вірогідне майже двократне зниження амплітуди спалаху та світлосуми H_2O_2-ХЛ за інгаляції обох сполук (рис. 1, 2). За впливу діакамфу також відмічалось зниження в 1,7 раза інтенсивності СХЛ (P<0,05) та у 1,5 раза світлосуми Fe^{2+}-ХЛ (0,05<P<0,1). Біохімічними дослідженнями стану ПОЛ та АОЗ тканини печінки виявлено лише підвищення в 1,6 раза активності каталази на тлі тривалої інгаляції фенсукциналу (від 3,9±0,9 мкат/л у контролі до 6,3±0,7 мкат/л у досліді; 0,05<P<0,1). Отже, наведені дані свідчать про те, що при подовженні терміну інгаляції антидіабетичні засоби викликають активацію системи АОЗ та АРЗ, а також зниження інтенсивності ВРПО та ПОЛ у печінці щурів. За впливу діакамфу одночасно прискорюються процеси окислення гідроперекисів ліпідів (зниження світлосуми Fe^{2+}-ХЛ; 0,05<P<0,1).

Одночасно з цими змінами у гомогенаті легень зареєстровано статистично значуще зниження інтенсивності СХЛ (фенсукцинал) та амплітуди швидкого спалаху Fe^{2+}-ХЛ (діакамф), що свідчить про уповільнення процесів ВРПО (рис. 3, 4), ознаки якого, як показано вище, були виявлені у мікросомах печінки щурів. Такої спрямованості порушення процесів ВРПО, але більш виражені, спостерігалися у легенях й за умов 15-денної інгаляції діакамфу.

На відміну від терміну дво- або три місячної інгаляції, через місяць по її завершенні зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу відбуваються тільки в тканині легенів, яка найбільш зазнає впливу сполук при безпосередньому контакті за умов їх інгаляційного надходження.

Рис. 1. *Хемілюмінесцентні параметри мікросомальної фракції печінки щурів за умов інгаляційного впливу фенсукциналу (n=8).*
*На рис. 1–4: * – вірогідно щодо контролю (P<0,05)*

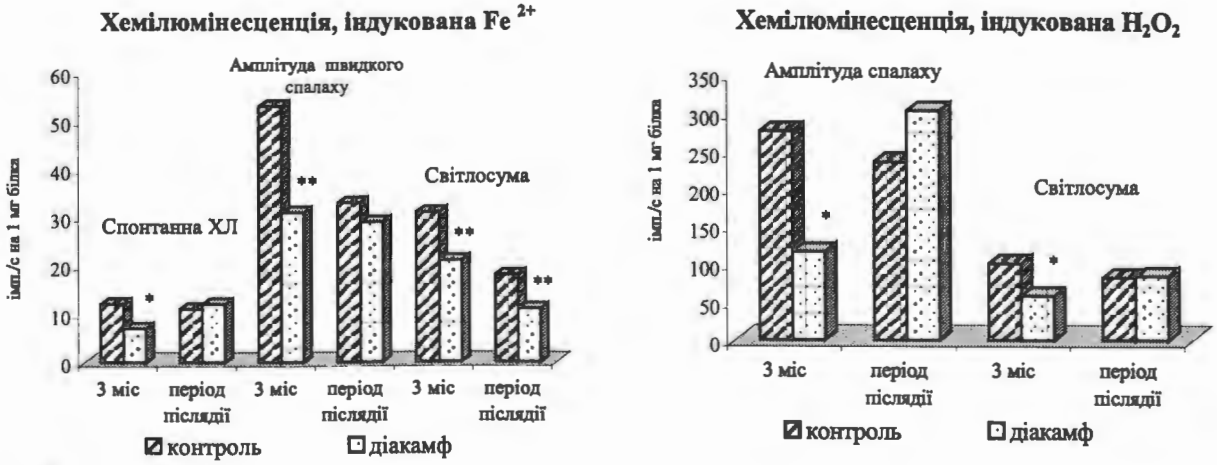

Рис. 2. *Хемілюмінесцентні параметри мікросомальної фракції печінки щурів за умов інгаляційного впливу діакамфу (n=8).*
*На рис. 2, 4: ** – відхилення має характер тенденції (0,05<P<0,1).*

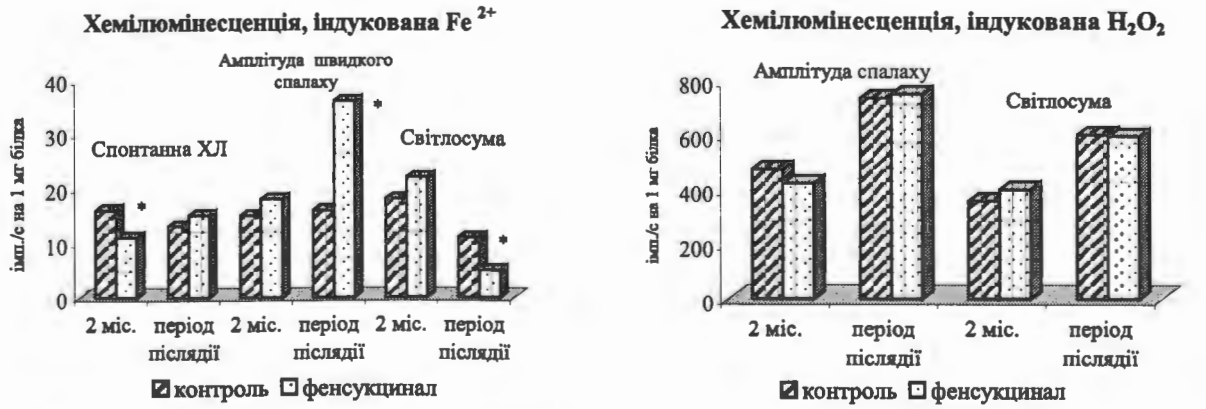

Рис. 3. *Хемілюмінесцентні параметри гомогенату легенів щурів за умов інгаляційного впливу фенсукциналу (n=8).*

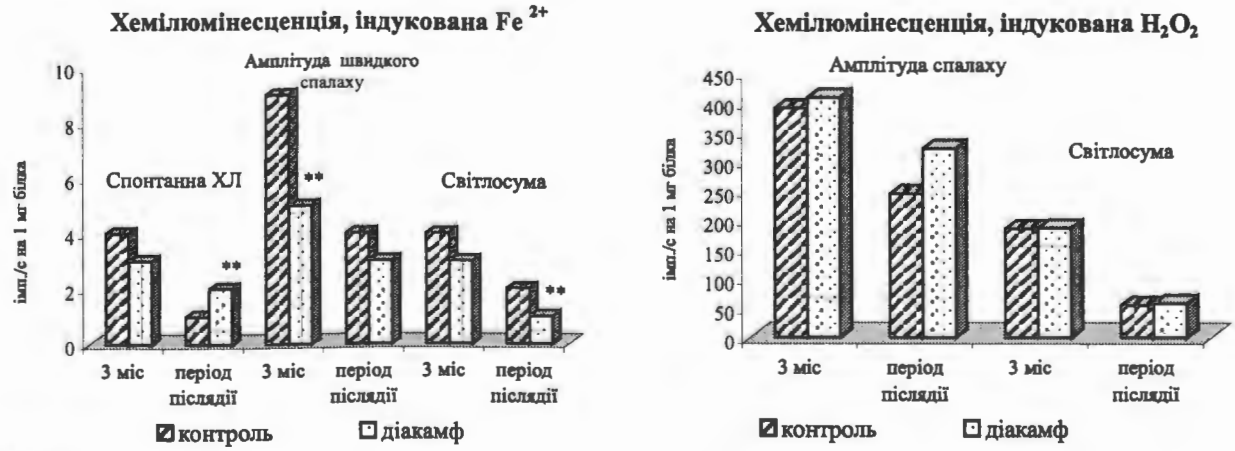

Рис. 4. *Хемілюмінесцентні параметри гомогенату легенів щурів за умов інгаляційного впливу діакамфу (n=8).*

Стан системи АОЗ легенів у період післядії фенсукциналу характеризує зниження активності СОД (до 18,5±2,0 ум. од./мг білка у досліді проти 24,3±2,2 ум. од./мг білка у контролі; 0,05<P<0,1), діакамфу – зниження рівня вітаміну Е (до 0,41±0,09 нмоль/мг білка у досліді проти 0,84±0,12 нмоль/мг білка у контролі; P<0,05). Послаблення системи АОЗ певною мірою може сприяти активації процесів ВРПО, що виходить з підвищення у 2 рази інтенсивності СХЛ від впливу діакам-

фу (0,05<P<0,1) та амплітуди швидкого спалаху Fe^{2+}-ХЛ від дії фенсукциналу (P<0,05). Прискорення процесів окислення гідроперекисів ліпідів, про що свідчить статистично значуще дворазове зменшення світлосуми Fe^{2+}-ХЛ (див. рис. 3, 4), дещо перешкоджає їх накопиченню у тканині легенів по завершенні інгаляції обох сполук. У період післядії діакамфу також зареєстровано вірогідне зниження у гомогенаті легенів кінцевих метаболітів ПОЛ (основ Шиффа).

У сироватці та цільній крові змін показників ПОЛ та АОЗ не виявлено протягом усього експерименту.

Наведені дані свідчать про фазні зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу у легенях та печінці щурів, характер яких залежить від терміну інгаляційної експозиції та періоду післядії. За умов 15-денної інгаляції діакамф викликає зміни процесів ВРПО та ПОЛ: активацію у мікросомах печінки та уповільнення у тканині легень. Для 15 днів та місяця інгаляції фенсукциналом і місяця – діакамфом є характерною відносна стабільність процесів ВРПО, інтенсивність яких після більш тривалої експозиції обох сполук (2 або 3 місяці) відчутно знижується одночасно з активацією системи АРЗ та АОЗ печінки та легень щурів. Ці зміни більш виражені у печінці та є ознакою активації процесів метаболічної адаптації. У період післядії антидіабетичних засобів у легенях порушується баланс проти антиоксидантних процесів у бік переваги ВРПО за недостатністю компонентів АОЗ.

Поряд з порушенням вільнорадикального гомеостазу, за інгаляційного впливу антидіабетичних засобів спостерігаються також деякі, в основному тимчасові, зміни стану основних біохімічних процесів у печінці щурів. При дослідженні стану вуглеводного обміну через 15 днів інгаляції діакамфом в концентрації 3,5±0,08 мг/м^3 зареєстровано лише тенденцію до вірогідного підвищення у межах фізіологічної норми вмісту глюкози у крові щурів (до 4,6±0,2 ммоль/л у досліді проти 3,4±0,1 ммоль/л у контролі; 0,05<P<0,1). За такого терміну експозиції фенсукциналом в концентрації 1,51±0,38 мг/м^3 у гомогенаті печінки підвищується вміст глікогену (від 4756,4±464,7 мг% у контролі до 6445,8±362,5 мг% у досліді; P<0,05), що спостерігається також у період післядії діакамфу (підвищення від 2677,8±468,4 мг% у контролі до 3686,0±231,9 мг% у досліді; 0,05<P<0,1). Ці ефекти можна вважати компенсаторно-пристосувальними реакціями організму на інгаляційне надходження сполук, що може бути пов'язано з тимчасовими змінами ферментних систем, які забезпечують процеси гліколізу та глюконеогенезу, глікогенезу та глікогенолізу.

Зміни з боку ліпідного обміну виявлено лише за впливу діакамфу на окремих етапах дослідження. Після трьох місяців інгаляції він викликав зниження в сироватці крові вмісту холестерину (дослід – 2,7±0,1; контроль – 3,2±0,2 ммоль/л; P<0,05), яке не виходило за межі фізіологічної норми. Зниження показника у фізіологічних межах спостерігається й у період післядії сполуки (дослід – 2,8±0,1; контроль – 3,7±0,3 ммоль/л; P<0,05) та супроводжується збільшенням фракції β-ліпопротеїдів - ЛПНЩ (дослід – 1,7±0,1; контроль – 1,0±0,1 г/л; P<0,05), що є основним носієм холестерину плазми. Проте різна спрямованість змін цих показників у період післядії (для рівня холестерину у фізіологічних межах) не може свідчити про порушення відповідної функції печінки.

За інгаляційного впливу антидіабетичних засобів спостерігались також і зміни в рівні сироваткових білків, що залежали від терміну експозиції. Зокрема, після 15 інгаляцій фенсукциналом у сироватці крові підвищується лише рівень β-глобулінів (дослід – 15,3±1,1%; контроль – 12,1±0,2%; P<0,05), що при відсутності одночасного збільшення вмісту α_2- або γ-глобулінів не може вказувати на токсичний вплив сполуки на функціональний стан печінки. Через місяць інгаляції сполукою відмічається тенденція до вірогідного зниження у сироватці крові в 1,4 раза кількості γ-глобулінів (0,05<P<0,1). Враховуючи, що більшу їх частину представлено антитілами (імуноглобулінами), що забезпечують гуморальну захисну реакцію організму, напрямок змін цього показника може свідчити про деяке напруження імунної системи, що може бути однією з первинних реакцій організму на інгаляційне надходження хімічної сполуки.

Після 15 днів інгаляції діакамфом протеїнограма характеризується лише зниженням у сироватці крові рівня α_2-глобулінів (дослід – 16,0±0,6%; контроль – 19,2±0,8%; P<0,05), а після місяця інгаляції – зниженням рівня альбумінів (дослід – 33,9±2,8%; контроль – 40,7±1,8%), α_2-глобулінів (дослід – 15,7±1,0%; контроль – 18,3±0,7%) та коефіцієнту А/Г (дослід – 0,52±0,07; контроль – 0,69±0,06), але зміни цих показників статистично мають лише характер тенденції до вірогідного відхилення (0,05<P<0,1).

При продовженні інгаляції діакамфом до трьох місяців простежується зниження, проте у межах фізіологічної норми, загального вмісту білка сироват-

Таблиця

Показники стану неспецифічної резистентності організму щурів у динаміці інгаляційної експозиції фенсукциналом та діакамфом; X±Sx, n=8

Показник	Термін експозиції	Контроль	Фенсукцинал 1,51±0,38 мг/м³	Контроль	Діакамф 3,5±0,08 мг/м³
Фагоцитарний індекс, %	15 діб	71,9±1,3	83,7±0,9*	48,6±0,8	43,9±1,2*
Фагоцитарне число, од.		2,2±0,2	2,5±0,1	1,5±0,2	1,5±0,2
НСТ–тест, %		21,5±0,9	34,1±0,8*	11,5±0,7	6,6±0,7*
Титр гетерофільних аглютинінів		2,5±0,5	3,5±0,5	2,5±0,3	1,6±0,3
Фагоцитарний індекс, %	1 місяць	51,4±1,0	65,6±0,7*	54,1±0,8	44,3±0,7*
Фагоцитарне число, од.		1,6±0,1	1,7±0,1	1,4±0,1	1,6±0,1
НСТ–тест, %		18,8±0,6	26,3±0,7*	10,0±0,6	10,1±0,5
Титр гетерофільних аглютинінів		2,3±0,7	1,7±0,4	2,1±0,3	1,5±0,3
Фагоцитарний індекс, %	2 місяці (фенсукцинал), 3 місяці (діакамф)	49,4±1,5	59,3±1,7*	52,6±0,7	42,3±0,7*
Фагоцитарне число, од.		1,4±0,1	1,1±0,1	1,4±0,1	1,2±0,1
НСТ–тест, %		15,8±0,9	22,1±1,0*	11,1±0,7	9,3±0,6
Титр гетерофільних аглютинінів		3,8±0,6	2,6±0,5	3,6±0,5	3,3±0,5
Фагоцитарний індекс, %	Період післядії	55,9±1,3	71,0±0,6*	52,3±0,9	53,0±1,0
Фагоцитарне число, од.		1,7±0,1	1,4±0,1	1,4±0,2	1,2±0,1
НСТ–тест, %		14,6±1,0	26,0±0,8*	13,6±0,7	9,6±0,8*
Титр гетерофільних аглютинінів		2,7±0,4	2,0±0,09	2,5±0,3	2,1±0,4

*Примітка: * – P<0,05.*

ки крові (до 62,3±2,3 у досліді проти 69,2±1,1 у контролі; P<0,05) за рахунок зменшення рівня альбумінів (дослід – 27,9±1,9%; контроль – 33,1±1,4%; P<0,05). Паралельно у сироватці крові підвищується вміст β-глобулінів (дослід – 27,2±1,0%; контроль – 25,1±0,3%; 0,05<P<0,1) та γ-глобулінів (дослід – 17,3±1,1%; контроль – 13,8±0,9%; P<0,05), тому зниження коефіцієнту А/Г має лише характер тенденції до вірогідного відхилення (дослід – 0,39±0,04; контроль – 0,49±0,03%; 0,05<P<0,1). У період післядії залишається лише вірогідно підвищений рівень γ-глобулінів (дослід – 7,5±0,7%; контроль – 5,4±0,3%; P<0,05), а вміст інших фракцій білків у досліді та контролі статистично не відрізняється.

При інгаляції фенсукциналом протягом двох місяців збільшується фракція α_2-глобулінів (дослід – 24,8±1,4%; контроль – 21,2±0,1%; P<0,05), що може бути лише ознакою напруги функціонального стану печінки у сфері синтезу цих сироваткових білків. В період післядії, навпаки, зареєстровано тенденцію до зниження цієї фракції білків (дослід – 17,9±1,2%; контроль – 21,4±1,3%; 0,05<P<0,1) у поєднанні з вірогідним підвищенням рівня β-глобулінів у сироватці крові (дослід – 23,9±1,7%; контроль – 18,9±1,0%; P<0,05). Проте такої спрямованості зміни рівня цих білкових фракцій не можна оцінити як наслідок токсичного впливу сполуки.

Крім динамічних змін співвідношення білкових фракцій, зареєстровано епізодичне, вірогідне (P<0,05) підвищення у сироватці крові активності амінотрансфераз: АлАТ у межах фізіологічної норми після 15 днів інгаляції фенсукциналом (дослід – 0,31±0,02; контроль – 0,17±0,02 мккат/л) та у період післядії діакамфу (дослід – 0,37±0,03; контроль – 0,19±0,02 мккат/л), і АсАТ лише через місяць інгаляції діакамфу (дослід – 0,92±0,03; контроль – 0,81±0,03 мккат/л).

Серед показників, що характеризують функціональний стан нирок, змін не зареєстровано, за винятком підвищення до верхньої межі фізіологічної норми рівня хлоридів сироватки крові після трьох місяців інгаляції діакамфом (дослід – 108,8±7,0; контроль – 79,8±6,4 ммоль/л; P<0,05).

Інтегральна оцінка стану організму показала, що антидіабетичні засоби викликають фізіологічні зміни деяких гематологічних показників. Після двох місяців інгаляції фенсукциналом підвищується кількість еозинофілів (дослід – 1,5±0,1%; контроль – 0,63±0,13%; P<0,05) та скорочується час згортання крові (дослід – 165,5±6,3 с; контроль – 193,2±7,1 с; P<0,05). Останній ефект виявлено й у період післядії діакамфу (скорочення до 148,9±8,0 с у досліді проти 233,6±10,1 с у контролі; P<0,05) з одночасним зниженням рівня загального та окисленого гемоглобіну (до 113,5±7,4 та

110,9±7,5 г/л у досліді проти 138,6±3,2 та 135,8±3,1 г/л у контролі; P<0,05). Серед показників функціонального стану ЦНС лише за впливу фенсукциналу виявлено вірогідне підвищення орієнтовно-дослідницької та загальної суми поведінкової активності (2 місяці, P<0,05), але в період післядії ці показники відновлюються. Зареєстровано також падіння приросту маси тіла піддослідних щурів у перший тиждень після припинення інгаляції фенсукциналом, що складало 10% порівняно з контролем (P<0,05), за відсутності змін інших інтегральних показників у період післядії сполуки.

Дослідженнями потенційної імунотоксичної дії антидіабетичних засобів за умов інгаляційної експозиції виявлені зміни клітинних показників неспецифічної резистентності різного напрямку для даних сполук (таблиця).

Упродовж інгаляції фенсукциналом спостерігається стійке підвищення фагоцитарної активності нейтрофілів за рахунок збільшення у периферичній крові відсотку клітин, що беруть участь у процесі фагоцитозу (підвищення фагоцитарного індексу; P<0,05) за відсутності змін поглинаючої здатності нейтрофілів (фагоцитарне число). Цей ефект зберігається й у періоді післядії. Протягом всієї інгаляції фенсукциналом та у період післядії також підвищується метаболічна активність фагоцитів (їх окисно-відновний потенціал в НСТ-тесті; P<0,05). Отже, фенсукцинал чинить стимулюючу дію на фагоцитарну ланку неспецифічної резистентності за умов інгаляційного надходження до організму щурів.

За інгаляційного впливу діакамфу зареєстровано зниження фагоцитарної активності нейтрофілів, про що свідчить достовірне зменшення кількості фагоцитуючих клітин (зниження фагоцитарного індексу; P<0,05). Через місяць по завершенні інгаляції фагоцитарна функція нейтрофілів відновлюється. Поглинаюча здатність нейтрофілів (фагоцитарне число) не змінюється протягом всього експерименту. Окисно-відновний потенціал нейтрофілів, що є важливим показником їх фагоцитарної активності і пов'язаний з продукцією супероксиданіону (НСТ-тест), був пригнічений після 15 інгаляцій та в період післядії (P<0,05). Це може бути відображенням компенсаторно-пристосувальних реакцій, які на початку інгаляції пов'язані з відповіддю на хімічний стрес, а в період післядії – незначним гальмуванням метаболізму, що є наслідком деякої напруги імунних механізмів у період місячної та тримісячної експозиції. Отже, відновлення кількості фагоцитуючих нейтрофілів в період післядії, не зважаючи на деяке зниження їх метаболічної активності в порівнянні з контролем, може свідчити про те, що діакамф в концентрації (3,5±0,08) мг/м^3 не чинить імунотоксичної дії.

Дослідженнями гуморальної ланки неспецифічної резистентності організму за умов інгаляції фенсукциналу та діакамфу не виявлено вірогідних змін вмісту природних антитіл гетерофільних аглютинінів у крові щурів (див. табл.).

Таким чином, отримані результати показали, що антидіабетичні засоби фенсукцинал та діакамф за умов інгаляційного надходження до організму щурів в концентраціях 1,51±0,38 та 3,5±0,08 мг/м^3, відповідно, здатні викликати фазні порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу в печінці та легенях щурів, характер яких залежить від терміну інгаляційної експозиції. Після двох місяців інгаляції фенсукциналом та трьох – діакамфом в печінці та легенях знижується інтенсивність ВРПО завдяки стимуляції системи АРЗ та ЛОЗ, що свідчить про активацію процесів метаболічної адаптації. Проте у період післядії обох сполук баланс про- та антиоксидантних процесів зрушується у бік переваги ВРПО на тлі пригнічення системи ЛОЗ, що спостерігається лише в легенях щурів.

Фенсукцинал та діакамф при інгаляційному надходженні викликають зміни стану неспецифічної резистентності організму щурів, але напрямок виявлених змін відрізняється для кожної з досліджених сполук протягом всього експерименту. Для фенсукциналу протягом інгаляції характерна стимулююча дія на фагоцитарну та метаболічну активність нейтрофілів, що зберігається й у періоді післядії. Діакамф, навпаки, пригнічує фагоцитарну активність нейтрофілів у динаміці інгаляційної експозиції та знижує їх метаболічну активність при короткочасному надходженні (15 днів) та в періоді післядії. Наведені ефекти свідчать про чутливість клітинної ланки неспецифічної резистентності до дії досліджуваних лікарських засобів і можуть бути використані як маркери для оцінки їх впливу на організм.

Дослідження впливу антидіабетичних засобів на стан основних біохімічних процесів в організмі щурів показали, що вони здатні викликати зміни стану білкового обміну, що проявляється в динаміці їх інгаляційної експозиції у вигляді різного типу дисліпопротеїнемії, а також епізодичні, незакономірні зміни з боку вуглеводного та ліпідного метаболізму. Проте, аналізуючи характер та ступінь цих тимчасових змін, їх не можна оцінити як прояви токсичного порушення функціонального стану печінки.

Отже, критеріями інгаляційної токсичності антидіабетичних засобів є порушення прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу (активація процесів ВРПО, пригнічення системи АОЗ) та стану неспецифічної резистентності (зміни фагоцитарної та метаболічної активності нейтрофілів). З урахуванням цих критеріїв концентрацію фенсукциналу 1,51 мг/м^3 можна вважати близькою до Lim_{ch}, а концентрацію діакамфу 3,5 мг/м^3 – дещо вищою за Lim_{ch}.

З метою визначення критеріїв токсичної дії антидіабетичних сполук, які мають антиоксидантну активність, та їх гігієнічного регламентування можна рекомендувати для встановлення Lim_{ac} та Lim_{ch} поглиблене дослідження при інгаляційному надходженні показників стану прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу (серед них найбільш інформативними є хемілюмінесцентні) та стану неспецифічної резистентності. При встановленні Lim_{ch} можливе допущення скороченого терміну інгаляційної експозиції до двох місяців, що є достатнім для виявлення критеріїв несприятливої дії антидіабетичних сполук.

Висновки

1. Антидіабетичні засоби фенсукцинал та діакамф за умов інгаляції в концентраціях 1,51±0,38 мг/м^3 та 3,5±0,08 мг/м^3, відповідно, викликають динамічні перебудови прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, що характеризуються на тлі тривалої експозиції (2 або 3 місяці) уповільненням процесів ВРПО завдяки стимуляції системи АРЗ та АОЗ печінки та легенів, у період післядії – збільшенням утворення метаболітів ПОЛ за недостатності компонентів АОЗ в легенях щурів.
2. Особливістю інгаляційного впливу антидіабетичних засобів є зміни стану неспецифічної резистентності організму щурів, а саме фагоцитарної та метаболічної активності нейтрофілів (стимуляція для фенсукциналу та пригнічення для діакамфу).
3. Критеріями інгаляційної токсичності антидіабетичних засобів є порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу та стану неспецифічної резистентності.
4. Особливості методичних підходів щодо гігієнічного регламентування антидіабетичних сполук з антиоксидантною активністю полягають у поглибленому дослідженні при інгаляційному надходженні можливих змін прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу та стану неспецифічної резистентності організму, що є достатнім для визначення критеріїв токсичної дії сполук при встановленні для них Lim_{ac} та Lim_{ch}.

Література

1. Методичні вказівки з обґрунтування ГДК лікарських засобів у повітрі робочої зони і атмосферному повітрі населених місць//Метод. вказівки МВ 1.1.5-121-2005.- МОЗ України, Держ. сан. епід. служба.- К., 2005.- 30 с.
2. Козырева Ф.У., Семенова В.В., Сидорин Г.И. Критерии безопасности биологически активных веществ и проблемы их гигиенического регламентирования//II съезд токсикологов России (Москва, 10-13 ноября 2003 г.): Тез. докл.- М., 2003.- С. 133-134.
3. Почерняева В.Ф., Цебржинский О.И., Шиш Н.В. Прооксидантно-антиоксидантный гомеостаз//Буковинський мед. вісн.- 2005.- Т.9, №2.- С. 212-214.
4. Горбенко Н.І. Патогенетичне обґрунтування ефективності похідного янтарної кислоти – фенсукциналу в терапії цукрового діабету та його судинних ускладнень: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук.- Харків, 2004.- 36 с.
5. Мерзлікін С.І. Розробка і стандартизація оригінального антидіабетичного засобу на основі (±)-цис-3-(2(-бензімідазоліл)-1,2,2-триметилциклопентан-карбонової кислоти: Автореф. дис. ... д-ра фарм. наук.- Харків, 2004.- 36 с.
6. Владимиров В.А., Суслов Т.Б. Сверхслабое свечение в биологии//Тр. МОИП.- М.: Наука, 1974.- С. 38-51.
7. Bredford M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the protein-due binding//Anal. Biochem.- 1976.- V.72.- P. 248-252.
8. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот//Современные методы в биохимии.- М.: Медицина, 1977.- С. 63-64.
9. Стальная И.Д., Гаришвили Г.Т. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиабарбитуровой кислоты//Современные методы в биохимии.- М.: Медицина, 1977.- С. 73-78.
10. Moshynska O.V., Tretiak N.N., Anoshina M.Y., Yagovdick M.V. Hemoglobin-induced lipid peroxidation in anemia//Лікарська справа.- 2001.- №4.- С. 39-43.
11. Мишенева В.С., Горюхина Т.А. Наличие глютатиона в нормальных и опухолевых тканях человека и животных//Вопр. онкол.- 1968.- Т.14, №10.- С. 46-49.
12. Hansen L.G., Warwick W.J. Fluorometric micromethod for fat tocoferol//Clin. Biochem.- 1970.- V.30.- P. 225-229.

13. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы//Лабор. дело.– 1988.– №1.– С. 16.

14. Костюк В.А., Потопович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина//Вопр. мед. химии.– 1990.– №2.– С. 88–91.

15. Иммунологические методы/Пер. с нем. под ред. Г.Фримеля.– М.: Медицина, 1987.– С. 382–385.

16. Меньшиков В.В., Делекторская Л.И., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник.– М.: Медицина, 1987.– 386 с.

17. Чернушенко Е.Ф., Когосова Л.С. Иммунологические исследования в клинике.– К.: Здоров'я, 1978.– С. 20–21.

18. Кудря М.Я., Пивоваревич Л.П., Хипко С.Е. и др. Токсикологическая оценка фенсукцинала//Медицинская экология, гигиена производства и окружающей среды: Сб. науч. тр. ХГМУ.– Харьков, 1995.– С. 136–145.

19. Кудря М.Я., Іванов С.В., Устенко Н.В. та ін. Токсичність нового вітчизняного перорального антидіабетичного засобу «діакамф» при різних шляхах надходження до організму//Гігієнічні проблеми сучасного суспільства: Зб. наук. праць.– Львів: ЛДМУ, 2000.– С. 36–39.

20. Палагіна І.А., Колодуб Ф.А., Кудря М.Я. та ін. Окисні та вільнорадикальні процеси в механізмі токсичної дії антидіабетичних засобів із групи похідних дикарбонових кислот//Укр. біохім. журн.– 2004.– Т.76, №5.– С. 107–114.

Палагина И.А., Кудря М.Я., Колодуб Ф.А., Карпенко Н.А., Козарь В.В., Кавок Н.С., Устенко Н.В.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРИТЕРИЕВ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НЕКОТОРЫХ АНТИДИАБЕТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ДЛЯ ИХ ГИГИЕНИЧЕСКОГО РЕГЛАМЕНТИРОВАНИЯ

Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я.Данилевского АМН Украины, г. Харьков

В динамике ингаляционной экспозиции изучено влияние антидиабетических средств фенсукцинала и диакамфа на состояние целостного организма, отдельных его органов и систем с учетом изменений интегральных, функциональных, метаболических и иммунологических показателей у крыс. Установлены критерии ингаляционной токсичности этих лекарственных средств, которыми являются нарушения прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза и состояния неспецифической резистентности. Эти критерии рекомендованы для установления пороговых концентраций и гигиенического регламентирования антидиабетических соединений с антиоксидантной активностью.

Ключевые слова: антидиабетические средства, ингаляционная экспозиция, критерии токсичности, прооксидантно-антиоксидантный гомеостаз, неспецифическая резистентность, гигиеническое регламентирование

Palagina I.A., Kudrya M.Ya., Kolodub F.A., Karpenko N.O., Kozar V.V., Kavok N.S., Ustenko N.V.

DETERMINATION OF CRITERIA OF THE TOXIC EFFECT OF SOME ANTI-DIABETIC MEDICINES FOR THEIR HYGIENIC REGULATION

Institute of Endocrine Pathology Problems of AMS of Ukraine, Kharkov

The effect of anti-diabetic drugs Phensuccinal and Diacamph on the whole body and on its specific organs and systems with due account of changes of integral, functional, metabolic and immune indices in rats was studied in inhalation exposures. The criteria of inhalation toxicity of these drugs were established (disorders in pro-oxidant-antioxidant homeostasis and in the state of non-specific resistance). These criteria have been recommended for establishing threshold concentrations and hygienic regulation of anti-diabetic compounds with anti-oxidant activity.

Key words: anti-diabetic drugs, inhalation exposure, criteria of toxicity, pro-oxidant-antioxidant homeostasis, non-specific resistance, hygienic regulation

Надійшла: 21.11.2006

Контактна особа: Кудря Марія Яківна, зав. лаб. токсикології та гігієнічного регламентування лікарських засобів, канд. біол. наук, с.н.с. Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я.Данилевського АМН України, вул. Артема, 10, м. Харків, 61002 тел. роб.: (057) 7004536, тел. дом.: (057) 3438995, e-mail: ipep@vl.kharkov.ua