

Рекомендована д.ф.н., професором А.І.Березняковою

УДК 615.25.349.7

МОДЕЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМУ ДІЇ ГІПОГЛІКЕМІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ТА МЕТАБОЛІЧНУ АКТИВНІСТЬ ГЕПАТОЦИТІВ

Л.М.Малоштан, О.Ю.Петренко, О.М.Дика, В.А.Сіпливий

Українська фармацевтична академія

Виявлений двонаправлений характер впливу гіпоглікемічних препаратів на дихальну активність гепатоцитів. Встановлено, що гліфазин і глісульфазид значно сильніше, ніж глібенкламід збільшують концентрацію мітохондріальних субстратів. З'ясовано, що досліджувані препарати не впливають на активність глюконеогенезу.

Основним місцем протікання реакцій біотрансформації є паренхиматозні клітини печінки. Поглинаючи лікарські препарати, ці клітини одночасно служать первинним місцем їх дії [3, 7].

Використання ізольованих гепатоцитів, як моделі для вивчення специфічної активності, токсичності та біотрансформації лікарських речовин забезпечує ряд переваг порівняно з тканинними гомогенатами. В силу високої морфологічної гомогенності печінки та повного зберігання інтактною внутріклітинної структури в процесі виділення, ізольовані гепатоцити при взаємодії з лікарськими препаратами здатні адекватно відображати специфічні реакції організму.

В даному повідомленні узагальнено результати вивчення впливу нових гіпоглікемічних препаратів на дихальну активність, метаболізм вугледів та енергетичний стан гепатоцитів пацюків.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктом дослідження були гепатоцити печінки пацюків масою 200 - 250 г, виділені неферментним методом з використанням ЕДТА та вібрації [2]. Підрахунок клітин проводили в камері Горяєва. Життєздатність отриманої суспензії визначали по виключенню 0,3% розчину трипанового синього після інкубації гепатоцитів протягом 5 - 10 хвилин. Клітини в концентрації 2,0 мг/млн клітин інкубували в Кребс-Гензелейт бікарбонатному

буфері з 1% сироваточним альбуміном бика (БСА, фракція 5) в атмосфері газової суміші, в якій міститься 95% кисню та 5% вуглекислого газу при 37 °С. Під час інкубації відбирали проби для визначення вмісту АТФ та глюкози [4].

Дихальну активність визначали за допомогою закритого кисневочутливого електроду шляхом інкубації гепатоцитів в комірці об'ємом 1 мл при 37 °С та перемішування в Кребс-Гензелейт фосфатному буфері.

Швидкість глюконеогенезу визначали по різниці швидкостей вивільнення глюкози в присутності та відсутності субстратів глюконеогенезу (10 мм лактату та 1,5 мм пірувату) в ході інкубації [6].

В експерименті використовували нові гіпоглікемічні препарати — глісульфазид синтетичного та гліфазин — рослинного походження. Для порівняння використовували глібенкламід.

Результати дослідження.

Інтегральним показником морфофункціонального стану гепатоцитів є швидкість дихання \dot{V}_O [1]. З одного боку вона відображає життєздатність клітин, а з другого дозволяє оцінити енергетичний стан клітин, включаючи інтенсивність як систем, що беруть участь в генерації енергії, так і тих, що її споживають.

При дослідженні залежності між швидкістю ендogenousного дихання гепатоцитів та концентрацією досліджуваних препаратів встановлено, що при відсутності препаратів швидкість ендogenousного дихання становила 13-15 нмоль кисню/хв-млн клітин, відповідаючи фізичному рівню, характерному для цілої печінки (Рис.1).

Контакт з досліджуваними речовинами викликає однонаправлені зміни швидкості дихання гепатоцитів. При низьких концентраціях

лікарських речовин має місце стимуляція швидкості споживання кисню, а при високих — пригнічення. Однак, концентраційно залежна амплітуда цих змін виявилась різною для порівнюваних препаратів. Так, гліфазин в концентрації 0,5 - 1,0 мг/млн клітин максимально підвищував дихальну активність більш ніж на 30%; при підвищенні концентрації до 1,5 мг/млн клітин він пригнічував швидкість дихання до рівня контролю, а в більш високих концентраціях — пригнічував швидкість споживання кисню в се-

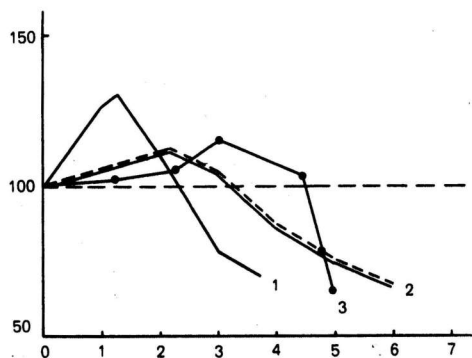


Рис. 1 Вплив препаратів гліфазину (1), глібенкламід (2) та глісульфазиду (3) на швидкість ендогенного дихання пацюків

редньому на 40% порівняно з контролем.

Синтетичні препарати глісульфазид та глібенкламід тільки частково збільшували швидкість ендогенного дихання. Максимальне збільшення було зареєстровано при їх концентраціях 2,0 та 3,0 мг/млн клітин. Воно становило 13%. А достовірне зниження швидкості — при концентрації 4,0 - 5,0 мг/млн клітин.

Одержані результати свідчать, що досліджувані препарати викликають двонаправлений характер змін дихальної активності клітин, що дозволяє допустити наявність різних цитологічних механізмів їх дії.

Збільшення дихальної активності при використанні низьких концентрацій гіпоглікемічних препаратів може бути зумовлено цілим рядом факторів: підсиленням активності систем, що приймають участь в витрачанні АТФ, збільшенням кількості субстратів, доступних для окислення в мітохондріях, роз'єднуванням окисного фосфорилування та інше.

Для з'ясування цього питання був проведений інгібіторний аналіз дихальної активності. В першу чергу проведені досліди з роз'єднанням окисного фосфорилування 2,4-динітрофенолом (ДНФ), який з одного боку, дозволяє оцінити

ступінь поєднання окисного фосфорилування, а з другого — відношення АТФ-вживаючих та генеруючих систем.

Таблиця 1

Вплив роз'єднувача ДНФ на дихальну активність гепатоцитів пацюків при наявності та відсутності досліджуваних препаратів

Добавки	Серія з гліфазином	Серія з глісульфазином	Серія з глібенкламідом
Без добавок	14,5 ± 1,3	13,8 ± 1,4	14,0 ± 1,2
ДНФ, 50 мкМ	22,7 ± 1,7	21,8 ± 2,0	22,6 ± 2,5
Препарат	28,5 ± 2,1*	21,3 ± 2,1	22,3 ± 3,0
Без добавок	14,7 ± 1,6	14,8 ± 1,5	14,0 ± 1,7
Препарат	19,6 ± 2,0	16,8 ± 1,6	18,1 ± 2,1
ДНФ, 50 мкМ	26,4 ± 2,0*	21,5 ± 2,2	22,1 ± 2,4

Примітка: P < 0,05; ДНФ - нмоль кисню/хв/млн клітин; гліфазин використовували в концентрації 3 мг/млн, глібенкламід - 0,5 мг/млн, глісульфазид - 2,0 мг/млн.

Із даних таблиці 1 видно, що роз'єднувач фосфорилування стимулює швидкість ендогенного дихання на 50 - 60%.

Гліфазин стимулює швидкість дихання клітин до добавки роз'єднувача, що відповідає даним рис. 1. Послідоюча добавка роз'єднувача збільшує швидкість вживання кисню ще на 35%. Причому ця швидкість дихання достовірно вище швидкості роз'єданого дихання в відсутності препарату. В той же час величина стимулювання дихання роз'єднувачем вища при відсутності гліфазину, ніж при його наявності (60 і 35% відповідно). Звертає на себе увагу той факт, що гліфазин, доданий після роз'єднувача, теж на 25% збільшує швидкість дихання.

Наведені результати можна пояснити слідуєчим чином. Той факт, що до добавки роз'єднувача рослинний комплекс — гліфазин стимулює дихання, може свідчити або про роз'єднування окисного фосфорилування, або про підвищення активності систем, вживаючих АТФ. Однак, враховуючи, що він стимулює вживання кисню і після добавки ДНФ, можна допустити, що механізм його дії зв'язаний не тільки з роз'єднуванням або з додатковим вживанням АТФ, але й, можливо, з підвищенням концентрації мітохондріальних субстратів або активності мітохондріальних ферментів (K, Na-АТФ).

Порівняно з цим глісульфазид та глібенкламід суттєво не впливали на швидкість вживання кисню до і після добавки роз'єднувача окисного фосфорилування. На цій основі можливо допустити, що синтетичні гіпоглікемічні препарати більш впливають на АТФ-генеруючі системи, ніж вживаючі АТФ.

Виходячи з отриманих результатів можна допустити, що пероральні гіпоглікемічні препарати підвищують швидкість гліколізу та глюконеогенезу. Для підтвердження цього припущення було виміряно вплив препаратів на рівень пірувату та лактату в клітинах.

З даних таблиці 2 видно, що при інкубації гепатоцитів без препаратів, вміст пірувату, лактату та їх сумарна кількість зберігаються на початковому фізіологічному рівні. Це свідчить про збалансованість метаболізму в ізольованих гепатоцитах. При введенні препаратів в середовище інкубації картина змінюється. А саме, в процесі 30-хвилинної інкубації гліфазин в концентрації 0,5 мг/млн клітин збільшує вміст пірувату в 2 рази, а в концентрації 1,0 мг/млн клітин більш, ніж в 4 рази. В той же час глісульфазид в концентрації 1,0 мг/млн клітин недостовірно, а в концентрації 2,0 мг/млн клітин достовірно збільшує вміст пірувату. При цьому ефект глісульфазиду був значно слабкіший, ніж гліфазину. Глібенкламід в концентраціях 1,0 мг/млн та 2,0 мг/млн клітин недостовірно збільшував вміст пірувату.

рослинний комплекс-гліфазин та синтетичний антидіабетик — глісульфазид стимулюють гліколіз. Вивченням активності глюконеогенезу після введення в середовище лікарських засобів встановлено, що вони не викликають достовірних змін в швидкості цього метаболічного шляху. При інкубації в концентраціях 0,5 мг/млн та 1,0 мг/млн клітин значення глюконеогенезу не виходили за межі фізіологічних значень і становили 1,8 - 2,5 нмоль утвореної глюкози на хвилину на млн. клітин.

ВИСНОВКИ

1. Досліджувані препарати здійснюють концентраційно залежну двонаправлену дію на дихальну активність гепатоцитів: при низьких концентраціях вони збільшують, а при високих пригнічують вживання рiсню клітинами. Цей показник значно вищий для гліфазину.

2. Гліфазин та глісульфазид в порівнянні з глібенкламідом значно збільшують концентрацію мітохондріальних субстратів, здатних окислюватись в дихальному ланцюзі за рахунок активації гліколізу.

Таблиця 2

Вплив препаратів на вміст лактату та пірувату при інкубації гепатоцитів пацюків

Умови досліджу	Вміст субстратів нмоль/млн клітин					
	Піруват		Лактат		Піруват+Лактат	
	0 хв.	30 хв.	0 хв.	30 хв.	0 хв.	30 хв.
Контроль	3,8±0,3	3,9±0,3	22,3±2,1	25,1±2,1	26,1±2,7	25,1±2,1
Гліфазин 0,5 мг/млн клітин	3,5±0,3	8,7±0,5*	26,3±3,7	28,1±2,9	30,0±3,1	36,8±3,0*
Гліфазин 1,0 мг/млн клітин	3,9±0,3	17,9±2,0*	19,9±2,6	22,6±2,7	23,9±2,0	40,9±3,7*
Глісульфазид 1,0 мг/млн клітин	3,9±0,5	4,3±0,6	25,4±2,6	24,5±2,3	29,5±2,1	30,2±2,1
Глісульфазид 2,0 мг/млн клітин	3,6±0,4	6,2±0,7*	24,2±2,2	30,1±2,9	28,1±2,9	36,6±3,2*
Глібенкламід 1,0 мг/млн клітин	3,7±0,21	4,5±0,7	23,5±3,5	29,7±4,1	27,2±3,5	34,2±4,2
Глібенкламід 2,0 мг/млн клітин	3,6±0,4	5,5±0,35	24,3±2,7	30,1±3,1	28,1±2,8	35,6±3,1

* P < 0,05

В слідуєчій серії досліджень було показано, що порівнювані препарати при інкубації гепатоцитів не впливали на вміст лактату. Однак, збільшення пірувату обумовлювало сумарне підвищення лактату+пірувату. Це дозволяє стверджувати, що

3. Проведені дослідження визначають перспективу подальшого поглиблення вивчення гліфазиду та глісульфазиду, як гіпоглікемічних препаратів перорального призначення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гепатоцит, функціонально-метаболические свойства / Под ред. Л.Д. Лукьяновой / М.: Наука, 1985.- 269с.
2. Петренко А.Ю., Грищук В.П., Сукач А.Н., Росляков А.Д., Белоус А.М. Энергетическое состояние гепатоцитов сытых крыс, выделенных с помощью ЭДТА и вибрации // Биохимия, 1989.- Т.54.- 10.- С.1750-1753.
3. Bellemann P., Gebhardt R., Mecke D. // *Analyt. Biochem.*, 1977.- Vol.81.- N2.- P.408-415.

4. Bergmeyer H.U., Bernt E., Schmidt F., Stark H. // *Meth. Enzym. Anal.*, Bergmeyer H.U. ed., Acad. Press, New York.- 1974.- P.1196-1201.
5. Kamo N., Muratcugu M., Hongoh R. // *Y.Membr. Biol.*, 1979.- 49.- P.105-121.
6. Mc Cune S.A., Durant P.J., Harris R.A., Jenkins P.A. // *Metabolism.*- 1981.- V.30.- N12.- P.1170-1179.
7. Wang S.R., Renaud G., Infante J., Catala D., Infante R. // *Metabolism.*- 1985.- V.21.- N9.- P.526-530.

УДК 615.25.349.7

МОДЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕПАТОЦИТОВ

Л.Н.Малоштан, А.Ю.Петренко, Е.М.Дикая, В.А.Сипливы
Исследовано влияние двунаправленного характера воздействия на дыхательную активность гепатоцитов: в низких концентрациях они повышают, а в высоких ингибируют потребление кислорода клетками. Доказано, что исследуемые препараты не влияют на активность глюконеогенеза.

UDC 615.25.349.7

THE MODEL OF RESEARCH OF MECHANISM EFFECTS OF HYPOGLYCEMIC PREPARATIONS ON TOLERANCE AND METABOLISM ACTIVITY OF THE HEPATOCYTES

L.N.Maloshtan, A.Yu.Petrenko, E.M.Dikaya, V.A.Siplivij
The modern experimental data of effects hypoglycemic preparations on tolerance and metabolism activity of the hepatocytes are present. It was found that the preparations increase glycogen-forming function of the liver.

**КИЇВСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ
ЗАГАЛЬНОЇ ТА КОМУНАЛЬНОЇ ГІГІЄНИ**

Інститут медичної праці

КИЇВСЬКИЙ ІНЖЕНЕРНО-БУДІВЕЛЬНИЙ ІНСТИТУТ

4-6 жовтня 1993 р. проводять у м. Києві симпозиум

**«ГІГІЄНА ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ
НАВКОЛИШНЬОГО ТА ВИРОБНИЧОГО СЕРЕДОВИЩА»**

На симпозиумі будуть розглянуті питання:

1. Біологічна дія електромагнітних випромінювань.
2. Гігієнічна оцінка та нормування її у навколишньому середовищі та промисловості.
3. Методи контролю електромагнітних випромінювань.
4. Принципи та заходи охорони здоров'я людей від шкідливої дії електромагнітних випромінювань.
5. Питання удосконалення гігієнічного нормування шуму, вібрації, мікроклімату та інших факторів.

Адреса оргкомітету: 253160, Київ, 94, вул. Попудренка, 50, КНДІ загальної та комунальної гігієни, Думанський Юрій Данилович, тел.559-29-90, Акименко Володимир Якович, тел. 559-25-92.