

УДК 616.379-008.64-085

Б. Н. Медведев, Л. Н. Малоштан, Е. Ю. Яценко

Национальный фармацевтический университет

ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ И МЕМБРАНОСТАБИЛИЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АДИАХРОМА

Проведено изучение антиоксидантной активности адиахрома на модели острого тетрахлорметанового гепатита, а также влияние адиахрома на состояние мембран эритроцитов по методу F.C. Jager. Установлено, что адиахром проявляет умеренное антиоксидантное действие, снижая концентрацию промежуточных продуктов ПОЛ ДК и конечных продуктов ПОЛ ТБК-активных продуктов; повышает уровень восстановленного глутатиона (G-SH), восстанавливая тем самым функции антиоксидантной системы организма животных, и обладает умеренным мембраностабилизирующим действием.

Ключові слова: сахарный диабет 2 типа; перекисное окисление липидов; антиоксидантная активность; мембраностабилизирующая активность

ВСТУПЛЕНИЕ

Дефицит инсулина или инсулиновая резистентность, являющиеся причиной СД, способствуют развитию окислительного стресса, который в свою очередь прямо и опосредованно приводит к развитию сосудистых осложнений [2, 15].

Окислительный стресс сопровождается значительным увеличением уровня свободных радикалов кислорода, которые запускают процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) плазматических мембран и образования конечных продуктов неферментного гликозилирования (КПНГ) в сосудистой стенке [16]. Это способствует структурным перестройкам клеточной мембраны: увеличивается её микровязкость, изменяется структура мембранно-связанных белков, и, как следствие, приводит к ухудшению инсулинорецепторного взаимодействия [3, 20]. Указанные изменения могут возникать в организме в тех случаях, когда скорость образования свободных радикалов превышает нейтрализующую способность ферментов антиоксидантной системы организма.

К настоящему времени почти полностью установлен механизм участия свободных радикалов в патогенезе сосудистых осложнений. Свободнорадикальные соединения (O_2^- и $ONOO^-$)

активируют скорость апоптоза, окисление липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и образование ядерного транскрипционного фактора NF- κ B. Последний с участием нескольких белков (с-фактор некроза опухолей, интерлейкин, $IL-1$ р, молекулы адгезии) опосредует механизмы, способствующие тромбогенной трансформации сосудистой стенки [21, 22].

При активации свободнорадикального ЛПНП в плазме крови эти частицы претерпевают окислительную модификацию и усиленно поглощаются моноцитами-макрофагами, которые превращаются в пенистые клетки, что способствует преатерогенной липидной инфильтрации стенки сосуда.

В связи с вышеизложенным логичным и патогенетически обоснованным является применение в комплексной терапии СД 2 типа препаратов с антиоксидантной направленностью действия [19], способных не только замедлять процесс прогрессирования специфических сосудистых осложнений, но и сохранять секреторные способности β -клеток и, влияя на фосфолипидный слой клеточной мембраны, повышать чувствительность к инсулину, обеспечивая тем самым более эффективную компенсацию СД [1].

Поэтому представляло интерес изучение антиоксидантной активности адиахрома на модели острого тетрахлорметанового гепатита.

© Б. Н. Медведев, Л. Н. Малоштан, Е. Ю. Яценко, 2010

Адиахром — пероральний синтетический препарат производное бензопирана был синтезирован на кафедре органической химии Киевского национального университета им. Т. Г. Шевченко под руководством академика Хили В. П.

Одним из механизмов развития диабетических ангиопатий считают наличие генетической предрасположенности к морфофункциональной аномалии клеточных мембран, реализующейся в сосудистую патологию через метаболические нарушения [6, 7].

В связи с этим целесообразно использование в лечении больных сахарным диабетом лекарственных средств мембраностабилизирующего действия [11]. Поэтому нами было проведено изучение мембраностабилизирующей активности адиахрома.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение влияния адиахрома на процессы ПОЛ и антиоксидантной защиты проводили на модели экспериментального гепатита у крыс, вызванного введением тетрахлорметана (CCl_4) [5].

Исследования проводили на белых беспородных крысах массой 180–220 г. Животные были разделены на четыре группы: 1-я группа — интактные животные, 2-я — контрольная, животные которой получали CCl_4 в дозе 0,8 мл/100 г, 3-я группа — опытные животные, получавшие адиахром в дозе 15 мг/кг и 4-я — животные, получавшие препарат сравнения витамин Е в дозе 50 мг/кг.

Влияние адиахрома на состояние мембран эритроцитов изучали на крысах массой 180–210 г по методу F. C. Jager [12], который базируется на спектрофотометрическом определении уровня внеэритроцитарного гемоглобина, поступающего в раствор вследствие спонтанного лизиса мембран эритроцитов, связанного с интенсификацией процессов ПОЛ, вызванных кислородом воздуха.

На протяжении 3-х дней животным внутривенно вводили адиахром в дозе 15 мг/кг и референс-препарат витамин Е в дозе 50 мг/кг. На 4-е сутки эксперимента у всех животных брали кровь из хвостовой вены и определяли степень гемолиза эритроцитов.

Результаты экспериментов подвергали обработке методами математической параметрической и непараметрической статистики [8, 10]. Статистически значимыми считали данные при уровне достоверности $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основным фактором, вызывающим атерогенную модификацию ЛПНП *in vivo*, являются

альдегиды — карбонильные соединения, образующиеся при свободнорадикальном окислении липидов — ТБК-активные продукты, а также снижение содержания восстановленного глутатиона как одного из факторов антиоксидантной защиты.

Поэтому показателями влияния адиахрома на ПОЛ служили ТБК-активные продукты, диеновые конъюгаты [14]. Состояние антиоксидантной системы оценивали по содержанию восстановленного глутатиона [17].

Тетрахлорметан в экспериментальной фармакологии является классическим мембранотропным токсином, вызывающим усиление свободнорадикального и перекисного окисления [13]. Механизм повреждающего действия тетрахлорметана связан с тем, что при участии микросомального цитохрома P450 происходит гемолитический распад ковалентной связи хлор-углерод, который сопровождается образованием свободных радикалов $Cl\cdot$ и $CCl_3\cdot$, выполняющих роль инициаторов цепных реакций ПОЛ. Вследствие гиперлипопероксидации происходит нарушение структуры и разрушение мембран [4]. Таким образом, введение экспериментальным животным тетрахлорметана вызывает интенсивные метаболические нарушения, которые развиваются последовательно, прогрессируют и суммируются.

Как следует из полученных результатов, формирование у животных группы контрольной патологии токсического поражения печени, обусловленного прооксидантным действием тетрахлорметана, проявляется активацией процессов перекисного окисления мембранных липидов — достоверный по сравнению с интактным контролем рост уровня ДК в 1,5 раза и ТБК-активных продуктов в 2,1 раза (рис. 1), с которым связано подавление функций антиоксидантной системы организма животных — истощение запасов G-SH в гомогенате печени в 1,5 раза (рис. 2) [18].

Применение антиоксидантов позволяет предупредить дестабилизирующее действие CCl_4 на печень, имеет прямое отношение к молекулярным механизмам неспецифической резистентности организма к стрессовым состояниям и метаболическим нарушениям в организме.

В результате эксперимента установлено, что в первые дни лечения адиахромом наблюдалось достоверное снижение активности ПОЛ. Адиахром проявлял умеренное антиоксидантное действие в сравнении с контрольной группой нелеченных животных. Это выражалось в снижении концентрации промежуточных продуктов ПОЛ ДК в 1,2 раза и конечных продуктов ПОЛ ТБК-активных продуктов — в 1,5 раза.

Также было оценено состояние ферментативной (глутатионзависимой) антиоксидантной си-

стемы, которая принимает участие в нерадикальной деструкции перекисей липидов. Основным компонентом этой системы является восстановленный глутатион (G-SH), который ингибирует активные формы кислорода, препятствует окислительной модификации тиоловых групп белков и принимает участие в нейтрализации ксенобиотиков. Уровень восстановленного глутатиона при действии разных стрессовых агентов независимо от их природы в большинстве случаев снижается [9, 17], причем причиной этого может быть как непосредственное взаимодействие глутатиона со свободными радикалами, так и его участие в реакциях, которые катализируются ферментами глутатионового цикла. Снижение уровня ВГ

в этих органоидах приводит к нарушению энергетического статуса клетки [13].

Под влиянием адиахрома в дозе 15 мг/кг наблюдалось восстановление функции антиоксидантной системы организма животных, на что указывает рост в гомогенате печени уровня восстановленного глутатиона (G-SH) в 1,7 раза по сравнению с контрольной патологией. Аналогичные данные были зафиксированы в группе животных, получавших препарат сравнения витамин Е.

На фоне тетрахлорметанового гепатита у животных после введения препарата сравнения наблюдалось достоверное снижение концентрации ТБК-реактантов, а также промежуточных продуктов ПОЛ ДК (в 1,9 и в 1,3 раза соответственно)

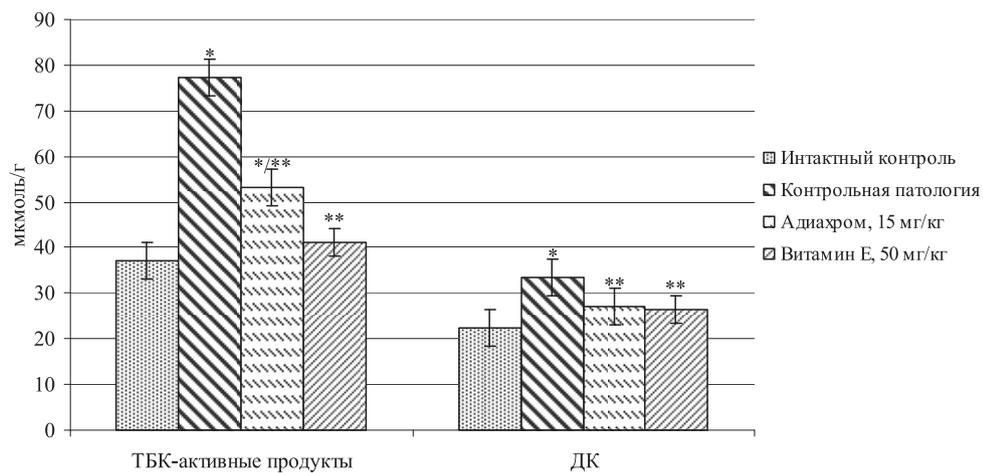


Рис. 1. Влияние адиахрома на уровень ПОЛ в условиях тетрахлорметанового гепатита (мкмоль/г, $M \pm m$, $n=5$); * — отклонение достоверно по отношению к интактному контролю, $P \leq 0,05$; ** — отклонение достоверно по отношению к контрольной патологии, $P \leq 0,05$.

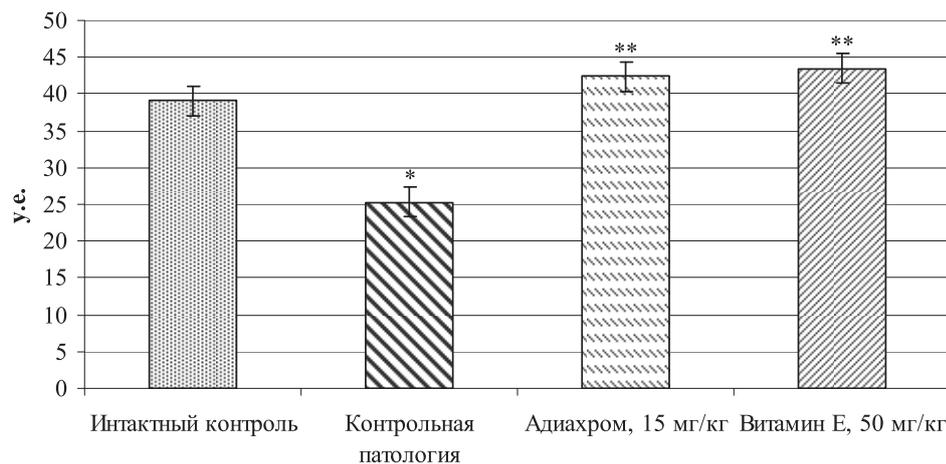


Рис. 2. Влияние адиахрома на уровень антиоксидантной защиты в условиях тетрахлорметанового гепатита (мкмоль/г, $M \pm m$, $n=5$); * — отклонение достоверно по отношению к интактному контролю, $P \leq 0,05$; ** — отклонение достоверно по отношению к контрольной патологии, $P \leq 0,05$.

в сравнении с контрольной патологией (рис. 1). Уровень восстановленного глутатиона повышался в 1,7 раза (рис. 2).

Перекисное окисление липидов связано с нарушением структуры мембран клеток, поэтому следующим этапом наших исследований было изучение мембраностабилизирующей активности производного бензопирана адиахрома.

По степени гемолиза эритроцитов можно судить о состоянии антиокислительных систем клетки. Если препарат снижает степень гемолиза, то это свидетельствует о его мембраностабилизирующем действии.

В норме спонтанный гемолиз у крыс, как правило, составляет 2–10 %.

Нами было установлено, что адиахром достоверно уменьшает степень спонтанного гемолиза. Введение животным исследуемого вещества —

адиахрома приводит к уменьшению степени гемолиза в сравнении с контрольной группой животных на 25,47 % (рис. 3).

Мембраностабилизирующий эффект адиахрома значительно уступает препарату сравнения — витамину Е, который уменьшает этот показатель на 54,14 % (рис. 4).

Таким образом, адиахром в дозе 15 мг/кг незначительно уменьшает степень спонтанного гемолиза в результате угнетения перекисной деструкции клеточных мембран эритроцитов и уступает мембраностабилизирующему действию препарата сравнения — витамину Е.

ВЫВОДЫ

1. Адиахром проявляет умеренное антиоксидантное действие в остром опыте на модели тетрахлорметанового гепатита, снижая

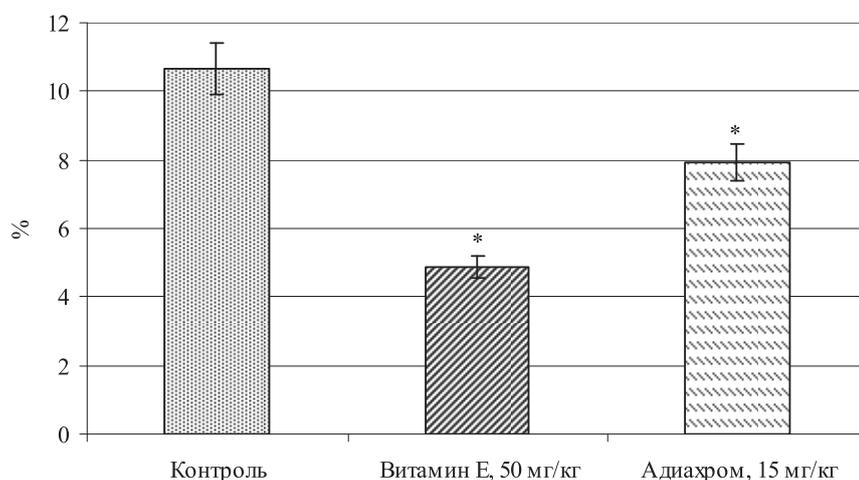


Рис. 3. Влияние адиахрома на степень спонтанного гемолиза эритроцитов (%), $M \pm m$, $n=5$, * — отклонение достоверно по отношению к контролю, $P \leq 0,05$.

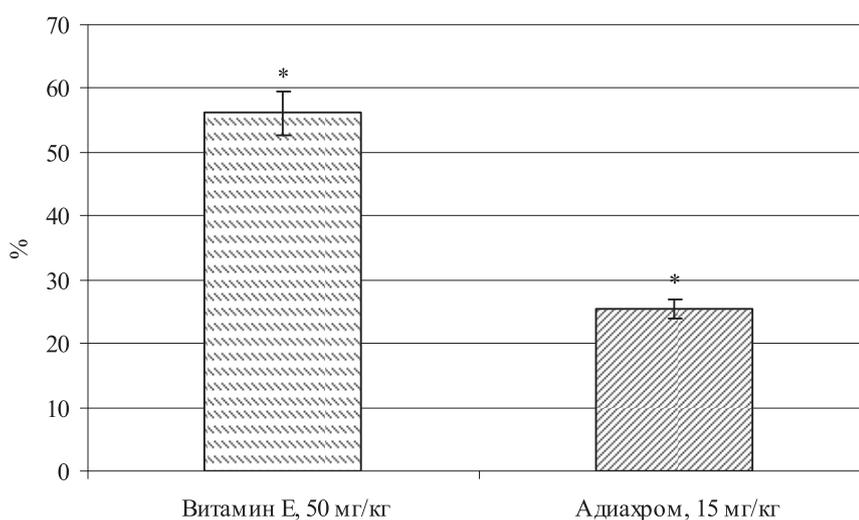


Рис. 4. Мембраностабилизирующая активность адиахрома на модели спонтанного гемолиза ($n=5$), * — отклонение достоверно по отношению к контролю, $P \leq 0,05$.

- концентрацію проміжних і кінцевих продуктів ПОЛ, а також підвищує рівень відновленого глутатіону (G-SH).
2. Установлено умерене мембраностабілізуєче дієвство адіахрому в опитях *in vitro* у здорових животиных.
 3. Адіахром являєтьсґ перспективним гіпоглікемієчим препаратом для зниження ризику формирова́ня мікро- і макрососудистих ускладнень СД 2 типу на фоні окислигельного стресса.

СПИСОК ІСПОЛЬЗОВАНИХ ІСТОЧНИКОВ ІНФОРМАЦІЇ

1. Балаболкин М. И. Лечение сахарного диабета и его осложнений: [учеб. пособ.] / М. И. Балаболкин, Е. М. Клебанова, В. М. Кремінська. — М.: ОАО Медицина, 2005. — 512 с.
2. Балаболкин М. И., Клебанов Е. М., Кремінська В. М. Патогенез и механизмы развития ангиопатий при сахарном диабете / М. И. Балаболкин, Е. М. Клебанов, В. М. Кремінська // Кардиол. — 2000. — № 10. — С. 74–87.
3. Балаболкин М. И. Роль дисфункции эндотелия и окислительного стресса в механизмах развития ангиопатий при сахарном диабете 2 типа / М. И. Балаболкин, В. М. Кремінська, Е. М. Клебанова // Кардиол. — 2004. — № 7. — С. 90–97.
4. Губский Ю. И. Молекулярные механизмы повреждения мембран гепатоцитов при экспериментальном поражении печени: автореф. дис... докт. мед. наук / Ю. И. Губский. — К., 1984. — 33 с.
5. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації] / Под ред. О. В. Стефанова — К.: Авіценна, 2001. — 528 с.
6. Ефимов А. С. Некоторые проблемы клинической диабетологии // Пробл. эндокринологии. — 1990. — № 4. — С. 52–55.
7. Зденко А., Шкрабало И. Развитие диабетологии — применение новых знаний на практике // Пробл. эндокринологии. — 1991. — № 4. — С. 1–4.
8. Иванов Ю. И. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам / Ю. И. Иванов, Р. Н. Погорелюк. — М.: Медицина, 1990. — 224 с.
9. Лабораторные методы исследования в клинике: [справ.] / [В. В. Меньшиков, Л. Н. Делекторская, Л. П. Золотницкая и др.] — М.: Медицина, 1987. — С. 275–276.
10. Лапач С. М. Статистичні методи в медико-біологічних дослідженнях із застосуванням Exel / С. М. Лапач, А. В. Чубенко, П. М. Бабич. — К.: Моріон, 2001. — 408 с.
11. Лукьянченков В. С. Спорные вопросы этиологии, патогенеза и лечения диабетической микроангиопатии // Кардиол. — 1991. — С. 88–91.
12. Посібник до лабораторних і семінарських занять з біологічної хімії: [навч.-метод. посіб. для вчз] / [Л. М. Вороніна, В. Ф. Десенко, В. М. Кравченко, Т. С. Сахарова.] — Х.: Основа, 1996. — 432 с.
13. Скакун Н. П. Клиническая фармакология гепатопротекторов / Н. П. Скакун, В. В. Шманько, Л. М. Охримович. — Тернополь: Збруч, 1995. — 344 с.
14. Стальная И. Д. Современные методы в биохимии / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили. — М.: Медицина, 1977. — С. 63–68.
15. Anfossi G. Contribution of insulin resistance to vascular dysfunction / [G. Anfossi, I. Russo, G. Doronzo, M. Trovati] // Arch. Physiol. Biochem. — 2009. — Vol. 115, № 4. — P. 199–217.
16. Baynes J. Perspectives in diabetes. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. // Diabetes. — 1991. — Vol. 40. — P. 405–412.
17. Bentler E. D. Improved method for the determination of blood glutathione / E. D. Bentler, Q. Duron, B. M. Kelly // J. Lab. Clin. Med. — 1963. — Vol. 61, № 5. — P. 882.
18. Glutathione pretreatment lessens the acute liver injury induced by carbon tetrachloride / B. Arosio, D. Santambrogio, N. Gagliano et al. // Pharmacol. Toxicol. — 1997. — Vol. 81, № 4. — P. 164–168.
19. Halliwell B. Oxidative stress markers in human disease: application to diabetes and to evaluation of the effects of antioxidants. In: Antioxidants in Diabetes Management / [L. Packer, P. Rosen, H. J. Tritschler, G. L. King et al.] eds. — Marcel Decker: New York, USA, 2000. — P. 33–52.
20. Hsueh W. A. Insulin resistance and the endothelium [text] / W. A. Hsueh, C. J. Lyon, M. J. Quinones // Am. J. Med. — 2004. — Vol. 117. — P. 109–117.
21. Olejnicka B. T., Andersson A., Tyrberg B. et al. Beta-cells, oxidative stress, lysosomal stability, and apoptotic/necrotic cell death / B. T. Olejnicka, A. Andersson, B. Tyrberg et al. // Antioxid. Redox Signal. — 1999. / — Vol. 1. — P. 305–315.
22. Wellen K. E. Inflammation, stress, and diabetes / K. E. Wellen, G. S. Hotamisligil // J. Clin. Invest. — 2005. — Vol. 115. — P. 1111–1119.

УДК 616.379–008.64–085

Б. М. Медведєв, Л. М. Малоштан, О. Ю. Яценко

**ВИВЧЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ ТА МЕМБРАНОСТАБІЛІЗУВАЛЬНОЇ
АКТИВНОСТІ АДІАХРОМУ**

Проведено вивчення антиоксидантної активності адіахрому на моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту, а також вплив адіахрому на стан мембран еритроцитів за методом F. C. Jager. Встановлено, що адіахром виявляє помірну антиоксидантну дію, знижуючи концентрацію проміжних продуктів ПОЛ ДК та кінцевих продуктів ПОЛ ТБК-активних продуктів; підвищує рівень відновленого глутатіону (G-SH), відновлюючи тим самим функції антиоксидантної системи організму тварин, та має помірну мембраностабілізувальну дію.

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу; перекисне окиснення ліпідів; антиоксидантна активність; мембраностабілізувальна активність

UDC 616.379–008.64–085

B. M. Medvedev, L. M. Maloshtan, O.Yu.Yatsenko

STUDY OF ANTIOXIDANT AND MEMBRANE STABILIZING ACTIVITY OF ADIACHROM

The study of antioxidant activity in models of acute adiachroma tetrachlormetane hepatitis and the effect of adiahroma on the state of erythrocyte membranes by the method F. C. Jager. Established that adiachrom shows moderate antioxidant effect, reducing the concentration of intermediate products of POL DC and end LPO products of TBA-active products, increases the level of reduced glutathione (G-SH), thereby restoring the function of antioxidant system of animals and a moderate membrane-stabilizing action.

Key words: diabetes militus of type 2; lipid peroxidation; antioxidant activity; membrane stabilizing activity

Адреса для листування:
61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12.
Кафедра біології, фізіології
та анатомії людини НФаУ
Тел. (057) 706-30-73

Надійшла до редакції:
06.12.2010