

Summary

USE OF ALTERNATIVE MODELS FOR *IN VITRO* RESEARCH NEPHROTOXICITY HEAVY METALS

Samokhina N.A.

Ukrainian Scientific and Research Institute of Transport Medicine, Odessa

Study nephrotoxicity heavy metals on alternative models *in vitro* — small intestine and red blood cells allows you to set the severity of the effects of the toxic effect of mercury, cadmium, lead and cobalt manifested in changes of marker indicators.

The blocking properties of membrane channels is expressed as mercuric chloride (0.1-1.0 mmol / l), and — in cadmium nitrate concentration 0.3 mmol / L. Cadmium chloride and lead nitrate show no stabilizing effect on the membrane of red blood cells, and have a toxic effect.

Keywords: *model in vitro, heavy metals, metalonephropaty, glutathione antioxidant system, osmotic resistance*

Впервые поступила в редакцию 04.06.2015 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования

УДК 616.31-018-092+616.379-008-64

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ АДАПТОГЕНОВ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ПОРАЖЕНИЙ ТКАНЕЙ ПОЛОСТИ РТА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

Скиба А.В., Левицкий А.П., Хромагина Л.Н., Скиба В.Я.

*Государственное учреждение «Институт стоматологии Национальной академии медицинских наук Украины», г. Одесса
flavan@mail.ru*

В эксперименте на белых крысах воспроизводили сахарный диабет 2 типа и проводили лечебно-профилактические мероприятия адаптогенами. Результаты показали, что при диабете 2 типа в исследованных тканях отмечается усиление процессов СРО липидов на фоне снижения активности ферментов антиоксидантной защиты и повышение уровня маркеров воспаления (содержания малонового диальдегида, общей протеолитической активности и активности кислой фосфатазы). Применение адаптогенов стимулирует адаптационно-трофическую систему организма и повышает устойчивость тканей полости рта к воздействию различных этиологических факторов.

Ключевые слова: *сахарный диабет 2 типа, адаптогены, слизистая оболочка щеки, печень, сыворотка крови, динамика развития, воспаление, перекисное окисление липидов.*

Введение

Сахарный диабет – хроническое заболевание, при котором нарушаются все виды обмена – углеводного, белкового, жирового, минерального и ранним развитием ангиопатий, возникающих в результате токсического действия высоких концентраций глюкозы [1].

При этом важная роль в патогенезе сосудистых осложнений отводится окислительному стрессу [2]. Активные формы кислорода усугубляют инсулинорезистентность, способствуют развитию ангиопа-

тий. При сахарном диабете у больных отмечается также истощение баланса антиоксидантно/прооксидантных систем, что приводит к нарушению структурно-функциональной целостности мембран клеток тканей организма.

Повышение уровня конечных продуктов гликолиза приводит к увеличению проницаемости сосудистой стенки, гипоксии. Одной из ведущих концепций патологии является признание важной роли структурно-функциональной дестабилизации клеточных мембран в патогенезе воспали-

тельных, дистрофических и дегенеративных изменений. При этом гипоксия оказывает выраженное мембранодестабилизирующее действие [3]. В связи с этим рекомендуется при гипоксических состояниях назначать антиоксиданты, стимуляторы мембранорепаративных процессов, трансмембранные ингибиторы.

Целью настоящего исследования явилось изучение применения адаптогенов для профилактики поражений тканей полости рта при экспериментальном сахарном диабете 2 типа.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования проведены на 60 белых крысах самках линии Вистар стадного разведения, содержащихся на общем рационе вивария и имеющих свободный доступ к воде и пище. Животные были взяты в опыт в возрасте 1,5 месяцев. Они были произвольно разделены на группы – контрольную (2 группы интактных животных, выведенных из эксперимента в начале и при его завершении) и опытную (крысы, которым моделировали диабет 2 типа с введением препаратов адаптогенов). Сахарный диабет 2 типа воспроизводили по методу А. М. Ульянова и Ю. А. Тарасова путем введения протаминсульфата [4]. Препарат разводили на физиологическом растворе и вводили внутримышечно 2 раза в сутки в течение 2-х недель из расчета 18 мг/кг массы животных.

Животных выводили из опыта путем тотального кровопускания из сердца, проводимого под тиопенталовым наркозом (20 мг/кг) через 2 и 4 недели от начала эксперимента. Для биохимических исследований забирали кровь, выделяли слизистую оболочку полости рта, околоушные, поднижнечелюстные большие слюнные железы, поджелудочную железу. Навески тканей растирали в фарфоровых ступках с измельченным стеклом, прибавляли охлажденный физиологический раствор. Центрифугирование проводили в рефрижераторной центрифуге РС-6 при температуре + 4 °С в течение 15 минут при скорости 3000 об/мин. Биохимические исследова-

ния проводили в надосадочной жидкости центрифугата. Определение в тканях и сыворотке крови животных активности кислой (рН 4,8) и щелочной (рН 10,5) фосфатаз проводили по методу Bessey et al. в модификации А. П. Левицкого и соавт. [5]. Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой в соответствии с методикой, разработанной И. Д. Стальной и Т. Г. Гаришвили [6]. Общую протеолитическую активность (ОПА) определяли методом Кунитца в модификации А. П. Левицкого по гидролизу 2 % казеина при рН 7,6 путем оценки количественного содержания растворимых в трихлоруксусной кислоте продуктов расщепления с помощью реактива Фолина [7]. Общую протеолитическую активность выражали нмоль/с/л сыворотки или мкмоль/с/кг ткани. Активность каталазы определяли по методу М. А. Королюк и Л. И. Ивановой [8].

Все полученные результаты были сгруппированы и обработаны методом вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента [9].

Результаты исследования та их обсуждения

Через 2 недели с момента 1-го введения протамин в крови крыс, полученной из хвостовой вены, при помощи глюкометра LIFE SCAN провели определение уровня глюкозы. Полученные результаты свидетельствовали об 50 % увеличении уровня глюкозы в крови животным с диабетом, в сравнении с интактными крысами.

У всех животных опытных групп наблюдалась полиурия, что характерно для сахарного диабета типа 2 (инсулиннезависимого).

Результаты измерения массы больших слюнных желез (околоушных, поднижнечелюстных и подъязычных) интактных животных и животных с диабетом 2 типа в течение эксперимента представлены в таблице 1. В ней представлены результаты расчета органного индекса — относительной массы (мг/100 г массы тела)

больших слюнных и поджелудочной желез.

Полученные данные свидетельствуют о том, что относительная масса поднижнечелюстных слюнных желез через 2 недели после моделирования сахарного диабета 2 типа снижается и достоверно уменьшается уже к 4-й неделе эксперимента.

Развитие экспериментального сахарного диабета 2 типа у белых крыс привело к существенным изменениям в сыворотке крови, о чем свидетельствуют результаты проведенных биохимических исследований. В таблице 2 приведены полученные нами данные биохимических исследований в сыворотке крови.

Как и в сыворотке крови, в слизистой оболочке полости рта отмечается повышение содержания малонового диальдегида на фоне снижения активности ферментов антиоксидантной защиты. Антиоксидантной системе принадлежит ведущая роль в защите тканей от повреждающего действия перекисей и свободных радикалов образующихся при усилении процес-

сов свободнорадикального окисления липидов. Каталаза, как фермент антирадикальной защиты, реагирует со свободными радикалами и защищает клетки от повреждений. Поскольку основным субстратом перекисного окисления липидов являются полиненасыщенные жирные кислоты, то это приводит к увеличению проницаемости клеточных и субклеточных мембран.

В слизистой оболочке щеки при моделировании сахарного диабета 2 типа отмечается увеличение активности кислой фосфатазы. Учитывая важную роль лизосом в патологии клеток, можно предположить, что в механизмах поражений слизистой оболочки полости рта при сахарном диабете играет освобождение лизосомальных гидролаз и выход их в цитоплазму клеток с последующим их разрушением.

В тканях слизистой оболочки щеки через 2 и 4 недели отмечается достоверное увеличение общей протеолитической активности, а также увеличение активности кислой фосфатазы. Общая протео-

литическая активность (ОПА) определяет резистентность слизистой, а ее повышение указывает на снижение резистентности организма.

Нарушения метаболических процессов в слизистой оболочке щеки и возникшие микроангиопатии (о чем свидетельствуют полученные нами данные морфологических исследований) приводят к развитию изменений атрофического, дистрофического и воспалительного характера. Важная роль в патогенезе сосудистых осложнений отводится окислительному

Таблица 1
Влияние исследуемых препаратов на органный индекс больших слюнных и поджелудочной желез белых крыс, у которых воспроизвели диабет 2 типа ($M \pm m$)

Группы животных	Органный индекс исследуемых органов (мг/100г массы тела)		
	поднижнечелюстные	околоушные	поджелудочная
1. Интактная (начало эксперимента)	160 ± 6,3	99 ± 5,8	294 ± 25,8
2. Интактная (конец эксперимента)	156 ± 6,2	112 ± 7,5	264 ± 10,9
3. Контрольная - диабет 2 недели	154 ± 6,1	123 ± 7,8 $P_1 = 0,03$	281 ± 23,2
4. Контрольная - диабет 4 недели	129 ± 6,2 $P = 0,001$	104 ± 6,2	239 ± 19,3
5. Диабет 2 недели + кверцетин 100 мг/кг	166 ± 7,4	114 ± 5,2	242 ± 29,4
6. Диабет 4 недели + кверцетин 100 мг/кг	159 ± 5,9 $P_1 = 0,006$	103 ± 4,5	240 ± 20,6
7. Диабет 2 недели + инулин 800 мг/кг	170 ± 5,2 $P_1 = 0,07$	119 ± 9,0	263 ± 32,2
8. Диабет 4 недели + инулин 800 мг/кг	143 ± 4,3	100 ± 13,8	232 ± 4,7
9. Диабет 2 недели + настойка софоры 20 мг/кг	161 ± 5,7	111 ± 8,1	273 ± 15,8
10. Диабет 4 недели + настойка софоры 20 мг/кг	147 ± 3,2 $P_1 = 0,03$	83 ± 6,0 $P_1 = 0,03$	232 ± 11,7

Примечание. Здесь и во всех последующих таблицах достоверность отличий рассчитана: P — по отношению между показателями 1-й и 2-й групп животных; P_1 — между показателями 2-й и 4-й групп; P_2 — по отношению к показателям 3-й группы животных (диабет 2 недели); P_3 — по отношению к показателям 4-й группы животных (диабет 4 недели). Представлены $P \leq 0,10$.

Таблица 2

Влияние исследуемых препаратов на биохимические показатели сыворотки крови белых крыс, которым воспроизводили диабет 2 типа (M ± m)

Группы животных	Исследуемый показатель			
	содержание		активность	
	глюкозы моль/л	МДА мкмоль/л	каталазы мкат/л	ОПА нкат/л
1. Интактная (начало эксперимента)	5,81 ± 0,47	1,68 ± 0,16	0,317 ± 0,014	3,18 ± 0,15
2. Интактная (конец эксперимента)	5,48 ± 0,34	1,66 ± 0,13	0,306 ± 0,017	2,84 ± 0,28
3. Контрольная - диабет 2 недели	8,77 ± 0,83 P = 0,03	2,20 ± 0,10 P = 0,009	0,277 ± 0,003	3,67 ± 0,61
4. Контрольная - диабет 4 недели	6,71 ± 0,74	1,87 ± 0,16	0,291 ± 0,017	2,78 ± 0,47
5. Диабет 2 недели + кверцетин 100 мг/кг	5,63 ± 0,89	1,89 ± 0,17	0,411 ± 0,019	3,11 ± 0,70
6. Диабет 4 недели + кверцетин 100 мг/кг	4,33 ± 0,53	1,76 ± 0,15	0,356 ± 0,009	3,29 ± 0,42
7. Диабет 2 недели + инулин 800 мг/кг	5,59 ± 0,36	1,73 ± 0,08	0,410 ± 0,016	2,84 ± 0,60
8. Диабет 4 недели + инулин 800 мг/кг	4,82 ± 0,38	1,81 ± 0,21	0,320 ± 0,020	2,40 ± 0,93
9. Диабет 2 недели + настойка софоры 20 мг/кг	5,81 ± 0,56	1,77 ± 0,13	0,418 ± 0,014	3,13 ± 0,34
10. Диабет 4 недели + настойка софоры 20 мг/кг	5,06 ± 0,28	1,41 ± 0,14	0,350 ± 0,011	2,01 ± 0,15

стрессу, наблюдаемому при сахарном диабете. На основании проведенных исследований показано, что патогенетически обоснованным является применения антиоксидантов, которые ингибируют свободно-радикальное окисление.

Для коррекции выявленных нами нарушений мы применяли фармакопейные препараты, получаемые из растительного сырья: кверцетин, инулин из корней цикория и настойку софоры.

Таблица 3

Влияние исследуемых препаратов на биохимические показатели слизистой полости рта белых крыс, у которых воспроизводили диабет 2 типа (M ± m)

Группы животных	содержание МДА, мкмоль/г	Исследуемый показатель			
		активность			
		каталазы, мкат/кг	ОПА, нкат/кг	кислой фосфатазы мк-кат/кг	щелочной фосфатазы мк-кат/кг
1. Интактная (начало эксперимента)	21,1 ± 1,24	7,72 ± 0,37	154,6 ± 10,1	16,6 ± 1,51	15,4 ± 1,88
2. Интактная (конец эксперимента)	21,7 ± 1,82	7,52 ± 0,38	148,7 ± 16,7	14,0 ± 1,21	14,4 ± 2,01
3. Контрольная - диабет 2 недели	38,9 ± 2,86 P < 0,001	6,20 ± 0,24 P = 0,004	211,0 ± 20,5 P = 0,03	19,2 ± 1,62	9,52 ± 1,25 P = 0,03
4. Контрольная - диабет 4 недели	29,1 ± 2,05 P ₁ = 0,02	6,38 ± 0,26 P ₁ = 0,03	221,5 ± 23,3 P = 0,03	20,1 ± 1,52 P = 0,01	5,79 ± 0,72 P = 0,002
5. Диабет 2 недели + кверцетин 100 мг/кг	19,6 ± 1,45 P ₃ < 0,001	6,94 ± 0,32	168,8 ± 20,1	15,4 ± 1,59	7,35 ± 1,14
6. Диабет 4 недели + кверцетин 100 мг/кг	20,9 ± 1,92 P ₄ = 0,02	7,22 ± 0,30	178,1 ± 14,3	13,3 ± 1,29 P ₄ = 0,04	8,42 ± 1,04 P ₄ = 0,06
7. Диабет 2 недели + инулин 800 мг/кг	16,2 ± 1,25	7,61 ± 0,28	200,0 ± 28,0	9,43 ± 0,41 P ₃ < 0,001	4,26 ± 0,72 P ₃ < 0,001
8. Диабет 4 недели + инулин 800 мг/кг	17,2 ± 1,62 P ₄ < 0,001	7,45 ± 0,29	173,6 ± 22,8	13,6 ± 3,06	6,87 ± 0,71
9. Диабет 2 недели + настойка софоры 20 мг/кг	17,5 ± 1,17 P ₃ < 0,001	6,95 ± 0,41	171,6 ± 16,1	11,6 ± 1,27 P ₃ = 0,005	5,69 ± 0,91 P ₃ = 0,03
10. Диабет 4 недели + настойка софоры, 20 мг/кг	16,6 ± 1,22 P ₄ < 0,001	7,55 ± 0,40	191,5 ± 12,2	16,9 ± 1,26	7,58 ± 0,55 P ₄ = 0,08

Кверцетин относится к витаминным препаратам группы Р. Он обладает антиоксидантным, мембраностабилизирующим действием, снижает проницаемость капилляров, ускоряет процессы регенерации.

Инулин корней цикория относится к группе фруктанов, используемых в качестве сахарозаменителей, он оказывает благоприятный эффект на соотношение HDL и LDL холестерина в крови; способствует снижению артериального давления, используется диабетиками благодаря своему свойству мягко по-

нижать уровень сахара в крови.

Биологически активные вещества, экстрагируемые спиртом из плодов софоры японской, обладают гипогликемическим, противомикробным, противовоспалительным действием, снижает проницаемость сосудов.

Ежедневное введение животным опытных групп изучаемых препаратов привело к снижению содержания глюкозы в их крови до уровня показателей контрольных животных.

Применение препаратов приводило к также достоверному снижению процессов свободнорадикального окисления липидов, что подтверждается снижением количества малонового диальдегида (таблицы 2 и 3). Лечебно-профилактическое применение препаратов в динамике развития экспериментального сахарного диабета 2 типа привело также к увеличению активности каталазы, фермента антиоксидантной защиты.

Полученный эффект, на наш взгляд, обусловлен наличием в их составе данных препаратов значительных количеств веществ антиоксидантной природы которые, с одной стороны, могут участвовать в детоксикации перекиси водорода, гидроксид- и пероксид-радикалов а также реактивных видов азота, а с другой стороны, активировать активность антиоксидантных ферментов – каталазы.

Проведенные экспериментальные исследования дают основание для применения препаратов для профилактики поражений тканей полости рта и слюнных желез в клинике у больных страдающих сахарным диабетом.

Выводы

1. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при экспериментальном сахарном диабете 2 типа в слизистой щеки и сыворотке крови белых крыс отмечается усиление процессов свободнорадикального окисления липидов на фоне снижения ферментов антиоксидантной защиты.
2. Применение препаратов-адаптогенов

растительного происхождения стимулирует адаптационно-трофическую систему организма и повышает устойчивость тканей полости рта к воздействию различных патогенных факторов.

Литература

1. Гнатів В. В. Активні форми кисню в патогенезі ангіопатій при цукровому діабеті 2-го типу / В. В. Гнатів, Х. С. Демчак, М. Н. Бабуленко // Медична хімія. 2013. — № 1(54). — С. 145-149.
2. Балаболкин М.И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений диабета (лекция) / М. И. Балаболкин, Е. М. Клебанова // Проблемы эндокринологии. – 2000. – Т. 46, № 6. – С. 29-34.
3. Шамсиев С. Ш. Антиоксидантная и мембраностабилизирующая терапия гипоксических состояний у новорожденных / С. Ш. Шамсиев, В. И. Крылов, Ф. С. Шамсиев // Вестник АМН СССР. – 1990. – № 8. – С. 16 -18.
4. Ульянов А.М., Тарасов Ю.А. Инсулярная система животных при хроническом дефиците гепарина / Ульянов А.М., Тарасов Ю.А. // Вопросы медицинской химии. - 2000. - Т.46, №2. - С.149-154.
5. Bessey O.A., Lowry O.H., Brock M.Y. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with live cubic millimeters of serum // J. Biol. Chem. – 1946. – Vol. 164, № 1. – P. 321-329.
6. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот / И. Д. Стальная // Современные методы в биохимии / Под ред. Н.П. Ореховича – М.: Медицина. – 1977. – С. 63-64.
7. Левицкий А.П. Казеинолитическая и БАЭЭ–эстеразная активность слюны и слюнных желез крыс в постнатальном онтогенезе / А. П. Левицкий, Р. Г. Барабаш // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1973. – Т. 76, № 8. – С. 65-67.
8. Гирин С. В. Модификация метода определения активности каталазы в биологических субстратах / С.В. Гирин // Лабораторная диагностика. - 1999. - № 4. - С. 45-46.
9. Монцевичюте-Эрингене Е. В. Упрощенные математико-статистические методы в медицинской исследовательской работе / Е. В. Монцевичюте-Эрингене // Пат. физиол. и эксперим. терапия – 1964. —

№ 4. – С. 67-78.

References

1. Hnativ V.V., Demchak H.S., Babulenko M.N. Reactive oxygen species in the pathogenesis of angiopathy in diabetes mellitus type 2 // Medical Chemistry 1 (54) Volume 15, 2013, pp. 145-149
2. Balabolkin M.I., Klebanov E.M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of vascular complications of dyabetis (lecture) // Problems of endocrinology. — 2000. — Vol. 46, № 6. — P. 29-34.
3. Shamsyev S. S. Antioxidant and membrane stabilising therapy in hypoxic state of a newborn / S.S. Shamsyev, V.I.Krylov, F.S. Shamsyev // Journal of Medical Sciences of the USSR. — 1990. — № 8. — S. 16 -18.
4. Ulyanov A.M., Tarasov Y.A. Insular system of animals with Chronic deficiency of heparin/ / Questions of medical chemistry. — 2000. — Vol. 46, № 2. P. 149-154.
5. Bessey O.A., Lowry O.H., Brock M.Y. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with live cubic millimeters of serum // J. Biol. Chem. – 1946. – Vol. 164, № 1. – P. 321-329.
6. Stalnaya I.D. Method for determining diene conjugation of unsaturated fatty acids // Modern methods in biochemistry / Ed. N.P. Orekhovich — M.: Medicine. — 1977. -P. 63-64.
7. Levitsky A.P., Barabash R.G. Lytic casein and BAEE-esterase activity of saliva and salivary glands of rats in postnatal ontogenesis // Bulletin of Experimental. biology and medicine. — 1973. — Vol. 76, № 8. — P. 65-67.
8. Girin S.V. Modification of the method for determining the activity of catalase in biological substrates // Laboratory diagnostics. — 1999. — № 4. — S. 45-46.
9. Montsevichyute-Eringene E.V. Simplified mathematical and statistical methods in medical research // Pathola. physiol. and experimental. therapy — 1964. — № 4. — P. 67-78.

Резюме

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ
ЗАСТОСУВАННЯ АДАПТОГЕНІВ ДЛЯ
ПРОФІЛАКТИКИ УРАЖЕНЬ ТКАНИН
ПОРОЖНИНИ РОТА ПРИ ЦУКРОВОМУ
ДІАБЕТІ 2 ТИПУ

Скиба О.В., Левицький А.П.,
Хромагіна Л.М., Скиба В.Я.

В експерименті на білих щурах

відтворювали цукровий діабет 2 типу та проводили лікувально-профілактичні заходи адаптогенами. Результати показали, що при діабеті 2 типу в досліджених тканинах відзначається посилення процесів вільно-радикального окислення ліпідів на тлі зниження активності ферментів антиоксидантного захисту та збільшення рівня маркерів запалення (вмісту малонового діальдегіду, загальної протеолітичної активності та активності кислої фосфатази).

Застосування адаптогенів стимулює адаптаційно-трофічну систему організму і підвищує стійкість тканин порожнини рота до впливу різних етіологічних факторів.

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу, адаптогени, слизова оболонка щоки, печінка, сироватка крові, динаміка розвитку, запалення, перекисне окислення ліпідів.

Summary

EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION OF
APPLICATION OF ADAPTOGENS TO
PREVENT LESIONS OF ORAL TISSUES IN
TYPE 2 DIABETES

Skiba A.V., Levitsky A.P.,
Hromagina L.N., Skiba V.Ya.

In the experiment on white rats reproduced type 2 diabetes and performed treatments and preventive measures with adaptogens. The results showed that for the type 2 diabetes in the tissues examined, there is a growing free radical lipid peroxidation processes due to lower activity of antioxidant enzymes and increase in inflammatory markers (malondialdehyde content, total proteolytic activity and the activity of acid phosphatase). Application adaptogens stimulate adaptive- trophic system of the body and increases the resistance of oral tissues to the effects of different etiological factors.

Key words: type 2 diabetes, adaptogens, the buccal mucosa, liver, blood serum, the dynamics of inflammation, lipid peroxidation.

Впервые поступила в редакцию 10.06.2015 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования