

ASSESSMENT OF TOXIC IMPACT OF HYPOLYCEMIC DRUG GLICLAZIDE ON FUNCTIONAL AND METABOLIC INDICES OF HOMEOSTASIS

Kudrya M.Y., Palagina I.A., Ustenko N.V., Kudrya A.

ОЦІНКА ТОКСИЧНОГО ВПЛИВУ ГІПОГЛІКЕМІЧНОГО ЗАСОБУ ГЛІКЛАЗИД НА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА МЕТАБОЛІЧНІ ПОКАЗНИКИ ГОМЕОСТАЗУ

**КУДРЯ М.Я., ПАЛАГІНА І.А.,
УСТЕНКО Н.В., КУДРЯ О.В.**

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

УДК:
613.632.2→[615.252.349.7.099
:547.541.521]:57.033:577.12

Інсуліновий діабет (ЦД) є однією з основних причин інвалідизації та смертності населення в усьому світі через високий ризик та тяжкий перебіг діабетичних ускладнень (нефро- та ретинопатії, серцево-судинну патологію, трофічні язви діабетичної стопи, ураження гепато-біліарної системи). За прогнозами ВООЗ, кількість хворих на ЦД, у 90% яких діагностується ЦД 2 типу, може зрости у 2030 році до 366 млн. хворих з 171 млн., зареєстрованих у 2000 році [1]. В Україні за останні 10 років кількість діабетичних хворих збільшилась більше ніж в 1,5 рази та становить понад 1 млн. чоловік [2].

Необхідність задоволення потреб пацієнтів в ефективних та відносно дешевих пероральних засобах корекції ЦД 2 гостро ставить питання щодо зростання обсягу та розширення асортименту їх вітчизняного виробництва, що, у свою чергу, передбачає розробку надійних заходів профілактики можливого несприятливого впливу на здоров'я людини таких біологічно активних сполук,

а також виключення їхньої негативної дії на об'єкти довкілля. Для здійснення моніторингу виробничого та природного середовища пріоритетне значення має розробка відповідних гігієнічних стандартів безпеки на підставі всебічного вивчення токсичних ефектів антидіабетичних засобів (АДЗ) з урахуванням специфічних та неспецифічних механізмів токсикогенезу.

Серед пероральних АДЗ, що випускаються хіміко-фармацевтичними підприємствами України, лідируючими є похідні сульфоніл-сечовини (ПСС) — глібенкламід, гліклазид та глімепірид, які й досі широко застосовуються для корекції ЦД 2. ПСС, на відміну від інших груп АДЗ, можуть ефективно впливати на дві основні патогенетичні ланки захворювання — порушену секрецію інсуліну та інсулінорезистентність (ІР), але при їх застосуванні актуальними залишаються питання щодо побічних ефектів.

В умовах промислового виробництва ПСС є потенційно небезпечними факторами для здоров'я працівників, оскільки можуть викликати залежно від інтенсивності та часу експозиції різні функціонально-метаболічні порушення гомеостазу організму. Дотепер орієнтовно безпечний рівень впливу (ОБРВ) у повітрі робочої зони обґрунтовано та законодавчо затверджено тільки для глібенкламиду, який дорівнює 0,01 мг/м³, для гліклазиду та глімепіриду відповідні гігієнічні регламенти в Україні відсутні, що визначає актуальність дослідження їх в аспекті промислової токсикології.

Відомо, що ПСС II генерації гліклазид (N-[[[гексагідроциклопентану [с]піррол-2(1H)-іл)аміно]карбоніл]-4-метилбензосульфонамід) здатний відновлювати ранній пік секреції

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО СРЕДСТВА ГЛИКЛАЗИД НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГОМЕОСТАЗА

Кудря М.Я., Палагина И.А., Устенко Н.В., Кудря А.В.

В работе обобщены данные об особенностях токсического действия гипогликемического средства гликлазид — производного сульфонилмочевини 2 генерации.

Выяснено, что гликлазид является практически нетоксичным по критериям острой токсичности, не оказывает местного раздражающего действия, но обладает способностью к кожной резорбции. При субхронической экспозиции (1/20 ЛД₅₀) вызывает выраженную гипогликемию и угнетение активности системы антиоксидантной защиты.

Порог острого ингаляционного действия установлен на уровне 2 мг/м³ по критериям активации процессов липопероксидации и снижения общей антиоксидантной и антирадикальной активности. Предложен ориентировочный безопасный уровень воздействия гликлазида в воздухе рабочей зоны — 0,4 мг/м³.

© Кудря М.Я., Палагина И.А., Устенко Н.В., Кудря О.В.
СТАТТЯ, 2009.

інсуліну та посилювати її другу фазу, знижувати ІР, підвищувати утилізацію глюкози у м'язах та знижувати її печінковий синтез [3]. Окрім цього препарат має виражений гіполіпідемічний ефект, поліпшує апобілковий спектр плазми крові та позитивно впливає на мікроциркуляцію, систему гемостазу і деякі гематологічні показники. Гліклазид також має антиоксидантні властивості, знижуючи рівень ліпідних пероксидів у плазмі крові та активуючи супероксиддисмутазу (СОД) в еритроцитах. Завдяки зазначеним властивостям його застосування сприяє зменшенню ризику ускладнень ЦД 2, зокрема ретино-, нефрота кардіопатії [4].

Побічна дія гліклазиду може проявлятися у вигляді гіпоглікемії, слабкості, головного болю, запаморочення, підвищення активності АЛТ, АСТ, ЩФ у плазмі крові, зворотних тромбозитопенії, агранулоцитозу або лейкопенії та анемії, а також алергічних реакцій (свербіжу, еритеми, кропивниці) [5].

Нашими раніше виконаними дослідженнями встановлено деякі токсичні ефекти гліклазиду [6-8], але повна поетапна оцінка особливостей його пошкоджуючої дії за різних умов експозиції з визначенням критеріїв токсичності для його гігієнічного регламентування не була представлена. У зв'язку з цим **мета цієї роботи** полягала в аналізі та узагальненні даних щодо особливостей токсикодинаміки гліклазиду з урахуванням можливих функціонально-метаболических змін гомеостазу та у визначенні критеріїв його гострої та субхронічної токсичності для обґрунтування ОБРВ у повітрі робочої зони.

Матеріали та методи дослідження. Оцінку токсичних проявів та визначення ОБРВ гліклазиду проведено згідно з [9]. В експериментах використано 128 білих нелінійних статевозрілих щурів-самців (маса тіла 180-220 г) та 36 статевозрілих мишей-самців (маса тіла 20-25 г) розведення ДУ "Інститут проблем ендокринної патології АМН України". Утримування, маніпуляції з тваринами та їх знеживлювання здійснювали відповідно до "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (Україна, 2001). Тварин знеживлювали декапітацією під легким ефірним наркозом.

Середньосмертельну дозу (ЛД₅₀), яку визначали за умов одноразового перорального та внутрішньочеревного введення сполуки щурам і мишам, розраховували за методом В.Б. Прозоровського.

Місцеву подразнюючу та шкірно-резорбтивну дію сполуки досліджували при 20-разових аплікаціях 50% зависі у соняшниковій олії на депільовану шкіру спини щурів площею 4x4 см. Субхронічну токсичність вивчали в умовах 30-разового перорального введення сполуки щурам у дозі 500 мг/кг (1/20 ЛД₅₀). Для встановлення порогу гострої дії (Lim_{ac}) здійснювали інгаляцію щурів (протягом 4 год.) у пилових камерах у концентраціях (4,5±0,2) мг/м³ та (1,98±0,16) мг/м³.

У динаміці уніфікованими методами визначали гематологічні, гемореологічні, біохімічні та інтегральні показники, які характеризують стан організму у цілому, окремих органів та систем (крові, гемостазу, печінки, нирок, ЦНС).

Для характеристики стану вуглеводного обміну визначали вміст глюкози у крові (аналізатор глюкози "Ексан-Г") та глікогену у гомогенаті печінки, ліпідного (рівень загальних ліпідів, β-ліпопротеїдів, холестерину, тригліцеридів та фосфоліпідів у сироватці крові) і білкового (рівень загального білка, протеїнограми, тимолову пробу, активності АЛТ і АСТ у сироватці крові). Функціональний стан нирок оцінювали за вмістом у сироватці крові сечовини та хлоридів. У дослідженнях використовували стандартні тест-набори фірми "Pliva-Lachema" (Чехія) та "Sentinel CH" (Італія).

Дослідження стану пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) передбачали визначення вмісту дієнових кон'югатів, сполук, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБКАС) [10], та основ Шиффа (ОШ) [11] у сироватці та цільній крові, гомогенаті печінки та легень. Стан окислювальної модифікації білків (ОМБ) визначали за вмістом у сироватці крові продуктів білкової пероксидації: аліфатичні альдегіди- і кетон-динітрофенілгідрозони (ДНФ-гідрозони) нейтрального та основного характеру [12].

Стан системи антиоксидантного захисту (АОЗ) оцінювали за змінами у сироватці крові

рівня відновленого глутатіону (GSH) [13], у гомогенаті печінки і легень — вмістом вітаміну Е [14], активністю каталази (КАТ) [15] та СОД [16].

Для інтегральної оцінки стану вільнорадикального пероксидного окиснення (ВРПО), антирадикального захисту (АРЗ) і АОЗ у мікросомах печінки та гомогенаті легень вимірювали інтенсивність спонтанної хемілюмінесценції (СХЛ), амплітуду спалаху і світлосуму ХЛ (за 6 хв.), індукованої Fe²⁺- та H₂O₂ (Fe²⁺-ІХЛ, H₂O₂-ІХЛ) [17]. Вміст білка визначали методом М. Бредфорда [18].

Дані обробляли методами варіаційної статистики з використанням класичного t-критерію Ст'юдента та модифікованого критерію з роздільними оцінками дисперсій. Різницю вважали вірогідною при p<0,05.

Результати досліджень та їх обговорення. При вивченні гострої токсичності гліклазиду встановлені середньосмертельні дози (ЛД₅₀), які за перорального введення щурам та мишам становлять 9000 (8880±9120) мг/кг та 10200 (7900±13700) мг/кг маси тіла відповідно, при внутрішньочеревному введенні щурам — 1700 (1580±1820) мг/кг м.т. Отже, за критерієм ЛД₅₀ гліклазид належить до практично нетоксичних сполук (5 клас токсичності згідно з [19]).

Експериментально доведено, що гліклазид не проявляє подразнюючої дії на шкірні покриви та слизові оболонки ока. Проте сполука має здатність до шкірної резорбції, що проявлялось у вигляді різкого зниження рівня глюкози у крові (до 1,13 ± 0,06 ммоль/л у досліді проти 4,10 ± 0,10 ммоль/л у контролі, p<0,05) і, як наслідок, падіння вмісту глікогену у гомогенаті печінки (до 699±64 мкг/100 мг тканини у досліді проти 2096 ± 211 мкг/100 мг тканини у контролі, p<0,05). Зазначені метаболічні порушення, очевидно, були пов'язані з посиленням в умовах токсичного стресу енергетичного обміну та супроводжувались інтенсифікацією катаболізму ліпідів та білків, продукти якого застосовуються печінкою у процесі глюконеогенезу для часткової компенсації енергетичних витрат організму. Це підтверджується зменшенням у сироватці крові загального вмісту ліпідів

ASSESSMENT OF TOXIC IMPACT OF HYPO-GLYCEMIC DRUG GLICLAZIDE ON FUNCTIONAL AND METABOLIC INDICES OF HOMEOSTASIS
Kudrya M.Y., Palagina I.A., Ustenko N.V., Kudrya A.

The paper generalizes data on some peculiarities of toxic effects of a hypoglycemic drug Gliclazide — second generation sulphonylurea derivative. We found that Gliclazide is actually non-toxic as to the acute toxicity criteria and doesn't have a local irrita-

tion effect, but causes a dermal resorption. Within the subchronic exposition (1/20 DL₅₀) conditions Gliclazide caused the expressed hypoglycemia and inhibited the anti-oxidant protection system activity. Threshold of acute inhalation impact was established at the level of 2 mg/m³ as to criteria of the lypoper-oxidation processes activation and general anti-oxidant anti-radical activity reduction. We offered the tentative safe exposure level of Gliclazide impact in the occupational air at 0.4 mg/m³.

(0,56 ± 0,07 г/л — дослід, 0,80 ± 0,10 г/л — контроль, p<0,05) та білків (64,8 ± 2,0 г/л — дослід, 71,6 ± 1,1 г/л — контроль, p<0,05). З боку гематологічних показників зареєстровано вірогідне зниження кількості еритроцитів та скорочення часу згортання крові, серед інтегральних показників — підвищення коефіцієнта маси надниркових залоз, яке можна розглядати як прояв адаптації до токсичного впливу.

Дослідженнями субхронічної токсичності гліклазиду при пероральному введенні у дозі 500 мг/кг м.т. виявлено специфічний гіпоглікемічний ефект у вигляді вірогідного зниження рівня глюкози у крові протягом експерименту на тлі зменшення вмісту глікогену у гомогенаті печінки (табл. 1). Враховуючи механізм дії гіпоглікемічного засобу [4], ці зміни можуть бути зумовленими стимуляцією панкреатичних β-клітин, змінами інсулін-залежного обміну глюкози з прискоренням її окиснення у тканинах на тлі активації глікогенолізу у печінці. У сфері білкового метаболізму після 30 введень сполуки відзначали вірогідне зниження вмісту загального білка та активності АЛТ у сироватці крові. Ці зміни певною мірою можуть віддзеркалювати деяке напруження компенсаторно-приспосувальних процесів, спрямованих на підтримку системи гомеостазу організму на рівні, необхідному для забезпечення основних метаболічних процесів. При дослідженні ліпідного профілю зареєстровано вірогідне зниження рівня β-ліпопротеїдів — основного носія холестерину плазми (після 30 введень). Наприкінці експерименту виявлено зростання вмісту сечовини у сироватці крові, яке може бути ознакою інтенсифікації процесів протеолізу.

У системі АОЗ сироватки крові за умов 30-разового вве-

дення гліклазиду виявлено зменшення у 2 рази вмісту GSH (табл. 1) за відсутності змін біохімічних показників стану ПОЛ і ОМБ, а також хемілюмінесцентних параметрів, які характеризують інтенсивність ВРПО. Отже, відносна стабільність стану процесів ВРПО, очевидно, зберігалася за рахунок суттєвої напруги глутатіонової ланки АОЗ.

За умов субхронічної експозиції гліклазид не впливав на морфологічний склад та гемореологічні властивості крові, за винятком подовження часу згортання крові (30 введень), що інтегрально може вказувати на деяке пригнічення проце-

су гемокоагуляції у фазі протромбінутворення.

Серед інтегральних показників, що характеризують стан загальноотрофічних процесів, зареєстровано вірогідне підвищення коефіцієнтів маси печінки, нирок та надниркових залоз на тлі відставання приросту маси тіла щурів, яким вводили гліклазид, порівняно з контролем. Зростання коефіцієнтів маси внутрішніх органів піддослідних тварин, можливо, пов'язане з напругою метаболічних процесів, про що певною мірою свідчать виявлені зміни деяких метаболічних показників (таблиця 1).

Таблиця 1
Вірогідні зміни показників стану організму щурів в умовах субхронічного впливу гліклазиду, (X ± Sx, n=10)

Показник, одиниця вимірювання	Кратність введень	Контроль	Гліклазид, 500 мг/кг	
Біохімічні дослідження				
Глюкоза крові, ммоль/л	5	4,4±0,2	1,7±0,1	
	15	3,9±0,3	2,8±0,2	
	30	4,4±0,1	2,3±0,3	
Глікоген печінки, мкг/100 мг тканини	15	4293±498	2399±391	
	30	2689±209	1512±185	
Загальний білок сироватки, г/л	30	98,9±6,0	80,4±2,7	
АЛТ сироватки, мккат/л	30	0,563±0,046	0,375±0,056	
β-ліпопротеїди сироватки, г/л	30	0,62±0,08	0,35±0,03	
Сечовина сироватки, ммоль/л	30	4,04±0,20	5,72±0,59	
GSH сироватки, мг/100 мл	30	27,6±3,8	13,0±1,8	
Дослідження гемокоагуляції				
Час згортання крові, с	30	142,0±7,9	183,0±8,0	
Маса тіла та коефіцієнти маси внутрішніх органів				
Маса тіла, г	30	212,7±9,2	184,7±8,2	
Коефіцієнти маси внутрішніх органів:	печінка	30	33,7±1,2	42,1±1,9
	нирки	30	6,5±0,1	7,6±0,3
	надниркові залози	30	0,34±0,03	0,41±0,01

Примітка: рівень статистичної вірогідності порівняно з контролем — p<0,05.

умовах гострої інгаляції гліклазид викликає порушення у тканині легень прооксидантно-антиоксидантної рівноваги: на рівні концентрації $4,5 \text{ мг/м}^3$ — зниження загальної антиоксидантної та антирадикальної активності з підвищенням інтенсивності ПОЛ; у концентрації $1,98 \text{ мг/м}^3$ — активацію систем АОЗ і АРЗ з одночасним прискоренням окиснення метаболітів ПОЛ та ОМБ. Отже, залежно від діючих концентрацій сполука може проявляти як про-, так і антиоксидантний ефект. Враховуючи характер та ступінь змін стану АОЗ, АРЗ та ВРПО при інгаляції, поріг гострої дії — Lim_{ac} для гліклазиду становить близько 2 мг/м^3 .

Виходячи з вищезазначеного ОБРВ гліклазиду розраховано за формулами, які рекомендовані методичними вказівками [9], з використанням встановлених параметрів токсикометрії — $\text{Lim}_{\text{ac}} = 2 \text{ мг/м}^3$ і $\text{LD}_{50} \text{ в/ч} = 1700 \text{ мг/кг}$ та величин мінімальної та вищої терапевтичних добових доз (МДТД = $0,16 \text{ г}$, ВДТД = $0,32 \text{ г}$). У результаті отримано розрахункову величину ОБРВ у повітрі робочої зони, яка становить $0,4 \text{ мг/м}^3$.

Висновки

1. Похідний сульфонілсечовини гліклазид є практично нетоксичним за критерієм LD_{50} , не подразнює шкірні покриви та слизові оболонки ока, але здатний до шкірної резорбції з розвитком вираженої гіпоглікемії.

2. Специфічна токсична дія гліклазиду в умовах субхронічного надходження ($1/20 \text{ LD}_{50}$) проявляється у вигляді гіпоглікемічного ефекту та зниження активності глутатіонової ланки системи АОЗ, неспецифічна — у вигляді посилення катаболічних процесів у сфері білкового та ліпідного метаболізму для компенсації енергетичних втрат організму.

3. Критеріями гострого інгаляційного впливу гліклазиду є порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу у бік активації процесів ПОЛ на тлі пригнічення загальної антиоксидантної та антирадикальної активності тканини легень. За цими критеріями Lim_{ac} сполуки встановлено на рівні 2 мг/м^3 .

4. Запропоновано в якості гігієнічного нормативу величину ОБРВ гліклазиду у повітрі робочої зони, яка становить $0,4 \text{ мг/м}^3$.

ЛІТЕРАТУРА

1. Wild S., Roglic G., Green A. Global Prevalence of Diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030 // *Diabetes care*. — 2004. — Vol. 27, № 5. — P.123-124.

2. Горбенко Н.І. Патогенетичне обґрунтування ефективності похідного янтарної кислоти — фенсукциналу у терапії цукрового діабету та його судинних ускладнень: Автореф. дис. д-ра біол. наук. — Харків, 2004. — 34 с.

3. Корпачев В.В. Калиевые каналы и механизмы действия производных сульфонилмочевины // *Укр. мед. часопис*. — 2002. — Т. 6, № 3. — С. 16-22.

4. Weekes A.J. Диабетон MR — гліклазид модифицированного высвобождения: новый β -селективный сульфониламидный препарат с однократным суточным приемом как препарат первого выбора для лечения сахарного диабета II типа // *Укр. мед. часопис*. — 2002. — Т. 6, № 2. — С. 6-14.

5. Машковский М.Д. Фармакологический справочник — 2006. — На сайте: <http://www.pharmnews.kz/opisanie1/4633.html>; <http://www.pharmnews.kz/opisanie1/4637.html>

6. Кавок Н.С., Кудря М.Я., Колодуб Ф.А. та ін. Вплив антидіабетичного засобу гліклазиду на функціональний стан печінки, вільнорадикальні процеси та систему антирадикального захисту у щурів // *Пробл. ендокрин. патології*. — 2004. — № 4. — С. 59-65.

7. Палагина И.А., Кудря М.Я., Козарь В.В., Кудря А.В. Особенности метаболических и иммунологических изменений в организме крыс при субхроническом воздействии антидиабетических средств // *Токсикол. вестник*. — 2008. — № 2. — С. 16-21.

8. Кудря М.Я., Палагина И.А., Устенко Н.В., Мельниковская Н.В. Токсикологическая характеристика ингаляционного воздействия гипогликемических средств — производных сульфонилмочевины как вредных факторов производственной среды // *Укр. журн. з проблем медицини праці*. — 2008. — № 3 (15). — С. 41-48.

9. Методичні вказівки з обґрунтування ГДК лікарських засобів у повітрі робочої зони і атмосферному повітрі населених місць: МВ 1.1.5 — 121 — 2005 / МОЗ України, Держ. сан.-епід. служба. Розроб.: Омелянець Т.Г., Іутинська Г.О., Коваленко Н.К. та ін. — К., 2005.

10. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — 391с.

11. 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.

12. Мещишен І.Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові // *Буков. мед. вісник*. — 1998. — Т. 2, № 1. — С. 156-158.

13. Мишенева В.С., Горюхина Т.А. Наличие глутатиона в нормальных и опухолевых тканях человека и животных // *Вопр. онкологии*. — 1968. — Т. 14, № 10. — С. 46-49.

14. Hansen L.G., Warwick W.J. Fluorometric micromethod for fat tocoferol // *Clin. Biochem*. — 1970. — V. 30. — P. 225-229.

15. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майоров И.Г. Метод определения активности каталазы // *Лаб. дело*. — 1988. — № 1. — С. 16.

16. 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.

17. Владимиров В.А., Суслов Т.Б. Сверхслабое свечение в биологии // *Тр. МОИП*. — М.: Наука, 1974. — С. 38-51.

18. Bredford M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the protein-dye binding // *Anal. Biochem*. — 1976. — V. 72. — P. 248-252.

19. Сидоров К.К. О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения / В кн: Токсикология новых промышленных химических веществ / Под ред. А.А. Летавета, И.В. Саноцко-го. — М.: Медицина, 1973. — Вып. 13. — 158 с.

Надійшла до редакції
26.06.2009.