

TO THE PROBLEM OF AN ASSESSMENT OF NEPHROTOXICITY
OF NANOPARTICLES AND NANOMATERIALS

L.I. Vlasyk, N.Y. Andriychuk

Abstract. Examples of nephrotoxicity of metal nanoparticles (NP) are dealt with in the paper. It has been concluded to the effect of a necessity of elaborating modern approaches to an assessment of NPs and an accumulation of experimental data base of their nephrotoxicity, as an important component of a risk assessment of new nanodimensional materials and substances.

Key words: nephrotoxicity, nanoparticles, risk assessment.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi, Ukraine),
L.I. Medved Institute of Ecohygiene and Toxicology (Kyiv, Ukraine)

Рецензент – проф. Р.Б. Косуба

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 3 (63), part 2. – P. 71-73

Надійшла до редакції 22.08.2012 року

© Л.І. Власик, Н.Й. Андрійчук, 2012

УДК 547.466:546.221:612.13:591.5

Н.І. Волощук

СУДИННІ МЕХАНІЗМИ ФОРМУВАННЯ ГЕНДЕРНИХ ВІДМІННОСТЕЙ
НЕФРОТОКСИЧНОСТІ ДИКЛОФЕНАКУ У ЩУРІВ

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, Україна

Резюме. У дослідженні *in vivo* показано переважання активності ферментів-продуцентів вазодилатуючих молекул (простагландин Н-синтази, NO-синтази, цистатіонін- γ -ліази) у нирках самок щурів. У досліджах *in vitro* встановлено, що ізольовані фрагменти ниркової артерії самок більш виразно реагували на H_2S -індуковану релаксацію, ніж самців. Уведення диклофе-

наку знижувало активність досліджуваних ензимів та зменшувало вазорелаксуючу дію H_2S у тварин обох статей, більшою мірою у самців.

Ключові слова: гендерні відмінності, диклофенак, простагландин-Н-синтаза, NO-синтаза, цистатіонін- γ -ліаза.

Вступ. Порушення функції нирок за умов застосування нестероїдних протизапальних засобів (НПЗЗ) є одним із факторів, які не тільки зменшують ефективність лікування та інколи вимагають відміни цих препаратів, але і можуть призводити до серйозних порушень роботи видільних органів [1, 9]. У механізмах розвитку нефротоксичності НПЗЗ найбільш важливу роль відіграють розлади мікроциркуляції, зокрема, дисбаланс у системі продукції простагландинів (PgI_2 , $PgF_{2\alpha}$), вільних радикалів кисню, нітроген монооксиду, а також, як було нещодавно встановлено, гідроген сульфід (H_2S) [8]. У наших попередніх дослідженнях було встановлено існування гендерних відмінностей у порушеннях клубочкового та каналцевого апарату нирок за умов уведення НПЗЗ із переважанням нефротоксичності у тварин чоловічої статі, а також показано, що естрогени підвищують, а тестостерон – навпаки, знижує здатність організмів самців і самок «опиратись» пошкодуючій дії НПЗЗ та інших токсикантів [2].

Мета дослідження. Дослідити судинний компонент у механізмах розвитку гендерних відмінностей нефротоксичності НПЗЗ шляхом дослідження активності ферментів-продуцентів

простагландинів, нітроген монооксиду та гідроген сульфід у нирках щурів обох статей за умов впливу диклофенаку, а також оцінити патерн статевих відмінностей вазорелаксуючої дії H_2S щодо ниркової артерії щурів і модуляцію його під впливом досліджуваного НПЗЗ.

Матеріал і методи. Досліди виконані на 84 самках та самцях щурів обох статей, згідно з біоетичними нормами. У дослідженнях *in vivo* щурів дослідної групи вводили диклофенак натрію («Вольтарен», Novartis), 10 мг/кг внутрішньошлунково 1 раз на добу, 7 днів. Контрольні тварини отримували еквівалентну кількість розчинника за аналогічних режимів уведення. Продукцію простагландинів у гомогенатах нирок щурів нирках оцінювали на основі визначення сумарної активності простагландин-Н-синтази (P_gH-синтази) спектрофотометричним методом за накопиченням окисненої форми донору електронів адреналіну [4]. Дослідження продукції ферменту, який продукує іншу вазоактивну речовину – оксид азоту в нирках щурів різної статі, проводили за методикою [3], яка дозволяє оцінити сумарну активність NO-синтаз (eNOS та iNOS) за кількістю утвореного нітрит-аніона (NO_2^-). Вміст H_2S у сироватці крові визначали спектрофотометричним методом, заснованим на утво-

ренні тіоніну в реакції між сульфід-аніоном та пара-фенілендіаміном гідрохлориду в кислому середовищі за наявності іонів заліза (III). Активність цистатіонін- γ -ліази (ЦГЛ) оцінювали за приростом сульфід-аніона, вміст якого визначали за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном [5]. У досліджах *in vitro* тензометрично реєстрували скорочувальну активність ізольованих фрагментів ниркової артерії самців та самок щурів, його зміни за умов передінкубації з диклофенаком за допомогою аналогово-цифрового перетворювача National Instruments USB-6008/6009, з'єданого з персональним комп'ютером. Статистичну обробку отриманих результатів проводили в пакеті «STATISTICA 5.5» (належить ЦНІТ ВНМУ ім. М.І. Пирогова, ліцензійний № АХХR910A374605FA). Обчислювали середнє арифметичне значення (M) і стандартну похибку (m), оцінювали вірогідність відмінностей середніх величин (P) із використанням t-критерію Стьюдента. Вірогідною вважалася різниця за $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

Отримані результати показали існування гендерних відмінностей активності ферментів-продуктів вазоактивних молекул у нирках інтактних щурів. Так, нами виявлено переважання сумарної активності P_gH-синтази та NO-синтази в особин жіночої статі на 28,7 та 35,6 %, ніж у чоловічої (табл. 1). За умов уведення диклофенаку, активність цих ферментів статистично достовірно знижувалась як у самок, так і в самців досліджуваних тварин, однак більш істотне падіння активності зафіксовано в самців. Так, активність P_gH-синтази зменшувалась на 29,6 % у самців

проти 19,9 % – у самок, а NO-синтази – на 27,2 % проти 23,9 % у самок, відповідно. Отримані результати зіставляються з отриманими нами раніше даними про переважання екскреції нітратів та нітритів та статеву різницю в активності в нирках ферментів-продуктів активних форм кисню з переважанням перших у осіб жіночої статі, а других – у чоловічої, та поглиблення цих відмінностей за умов дії НПЗЗ [2].

Надалі ми встановили, що самки щурів істотно відрізняються від самців за вмістом ще одного потужного вазодилатора – гідроген сульфід у сироватці крові та активністю основного ферменту-продукту H₂S – ЦГЛ у гомогенаті нирок самців і самок щурів (табл. 2). При цьому концентрація H₂S та активність ЦГЛ у самок перевищувала таку в самців на 19,1 та 30,4 %, відповідно. При уведенні диклофенаку вміст H₂S та активність ЦГЛ у самців і самок знижувались, проте встановлені нами статеві відмінності не лише зберігались, але і дещо поглиблювались (табл. 2).

У дослідженнях *in vitro* нами також показано, що кільцеві фрагменти ниркової артерії самок щурів, передскорочені фенілефрином, мають більшу чутливість до вазорелаксуючої дії гідроген сульфід, порівняно із самцями. Диклофенак викликав зменшення H₂S-індукованої релаксації стінок досліджуваної судини в особин обох статей, причому його дія була більш виразною саме в самців (рис. 1). При порівнянні ефективних концентрацій (EC₅₀) гідроген сульфід для ниркової артерії у тварин різної статі показало, що цей параметр у самців-щурів становив 58,27±4,12 мМ, натомість у самок він був в 1,25 раза меншим, що

Таблиця 1

Вплив диклофенаку на сумарну активність P_gH-синтази та NO-синтази в нирках у самців і самок щурів (M±m)

Групи щурів	Сумарна активність P _g H-синтази (нмоль/хв на 1мг білка)		Сумарна активність NO-синтази (пмоль/хв на 1мг білка)	
	Самці	Самки	Самці	Самки
Контроль (n=7)	3,98±0,20*	5,56±0,21	7,21±0,28*	9,86±0,94
Диклофенак (n=10)	2,8±0,14*#	4,45±0,12#	5,25±0,25*#	7,7±0,44#

Примітка. 1.* – статистично вірогідні відмінності між самцями та самками; 2. # – статистично вірогідні відмінності відносно контролю у тварин відповідної статі; P_g – простагландин

Таблиця 2

Вплив диклофенаку на вміст гідроген сульфід у сироватці крові та активність цистатіонін- γ -ліази в нирках самців та самок щурів (M±m, n=10)

Групи щурів	Вміст гідроген сульфід у сироватці крові (мкмоль/л)		Активність цистатіонін- γ -ліази в нирках щурів (нмоль/хв на 1мг білка)	
	Самці	Самки	Самці	Самки
Контроль	73,9±3,12*	86,9±4,99	1,38±0,08*	1,78±0,17
Диклофенак	56,2±6,60*#	76,6±4,34	0,99±0,08*#	1,40±0,05#

Примітка. 1.* – статистично вірогідні відмінності між самцями та самками; 2. # – статистично вірогідні відмінності відносно контролю у тварин відповідної статі

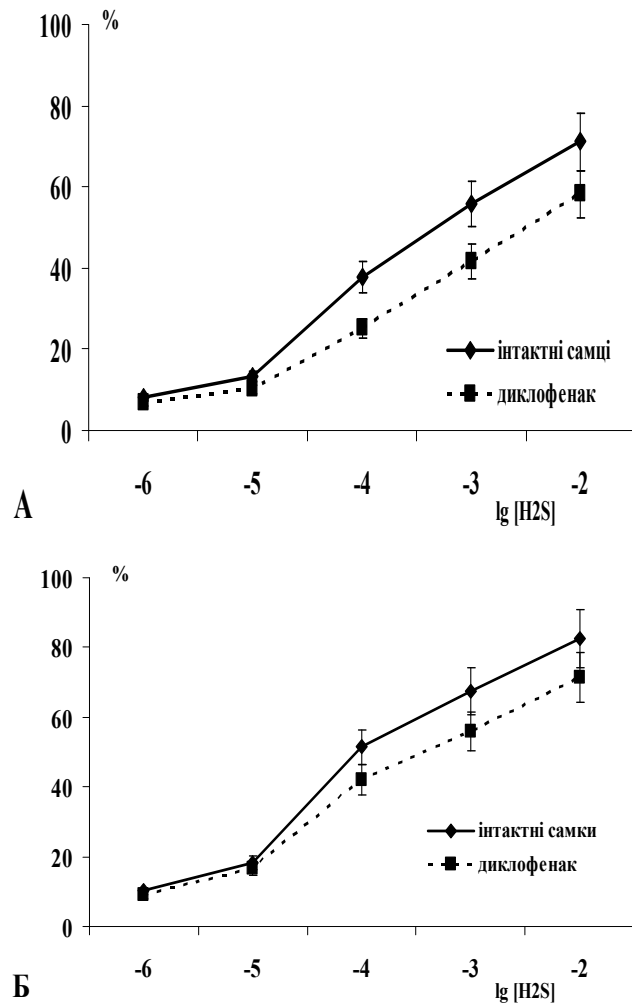


Рис. 1. Дозозалежність H_2S -стимульованого розслаблення кільцевих фрагментів ниркової артерії самців (А) і самок (Б) щурів під дією диклофенаку натрію

Примітка. По осі абсцис – десятковий логарифм концентрації H_2S (М) у суперфузійному розчині, по осі ординат – нормована інтенсивність розслаблення кільцевих фрагментів досліджуваних судин під впливом зростаючих концентрацій H_2S . За 100% прийнятий рівень H_2S -стимульованого розслаблення досліджуваних кільцевих фрагментів судин, який по амплітуді відповідає максимальному значенню фенілефрин-індукованого передскорочення. Наведені усереднені дані 5 дослідів і значення похибок середнього

свідчить про більшу чутливість досліджуваних судин релаксуючої дії H_2S саме тварин жіночої статі. Попередня інкубація фрагментів ниркової судини з диклофенаком у самців призводила до підвищення показників EC_{50} H_2S , у середньому на 19,8 %, тоді як у самок це зростання було вірогідно меншим і становило в середньому лише 12,0 %.

Таким чином, ми отримали докази того, що в основі меншої схильності особин жіночої статі до нефротоксичного впливу НПЗЗ лежить судинний фактор, а саме – більша продукція в нирках тварин цієї статі вазодилатуючих та менша – вазоконстрикторних молекул, порівняно із самцями. Причиною існування виявлених нами статевих відмінностей є причетність гонадальних гормонів до регуляції експресії чи модуляції активності ензимів, залучених до утворення вазоактивних молекул [7]. Вплив диклофенаку натрію на систему продукції цих месенджерів, на нашу думку, може зумовлюватися впливом на експресію

генів, причетних до синтезу простагландинів, NO та H_2S -продукуючих ферментів та підвищенням продукції активних форм кисню, що було нами показано раніше [2]. Таке посилення синтезу супероксидного аніон-радикала та інших кисневих дериватів під впливом диклофенаку натрію може індукувати ковалентну модифікацію активних центрів ферментів і тим самим знижувати їх активність [6]. Останнім часом показані агоністичні взаємовідношення між системами продукції оксиду азоту та гідроген сульфиду [8]. Тому, виявлене нами диклофенак-ініційоване зниження активності NO-синтази та вмісту стабільних метаболітів нітроген монооксиду в нирках може бути одним із чинників формування дефіциту H_2S за умов дії НПЗЗ.

Висновок

Системи продукції вазоактивних молекул, зокрема, простагландинів, нітроген монооксиду та гідроген сульфиду є важливими метаболі-

чними мішенями, через які реалізуються нефротоксичний ефект нестероїдних протизапальних засобів. Більш високий рівень базальної продукції цих вазодилаторів у нирках самок щурів, порівняно із самцями, а також секс-специфічний характер їх змін за умов уведення диклофенаку є важливим елементом, який забезпечує різну чутливість чоловічого та жіночого організму до нефротоксичної дії нестероїдних протизапальних засобів.

Перспективи подальших досліджень. Враховуючи встановлені статевозалежні зміни нефротоксичної активності НПЗЗ, вважаємо за перспективне подальше дослідження нефротоксичних ефектів окремих НПЗЗ у тварин різної статі.

Література

1. Викторов А.П. Побочное действие современных нестероидных противовоспалительных препаратов: проблемы остаются? / А.П. Викторов // Укр. мед. часопис. – 2003. – № 1 (33). – С. 79-89.
2. Волощук Н.І. Рівень статевих гормонів як предиктор нефротоксичної дії диклофенаку натрію у самок та самців щурів / Н.І. Волощук // Biomedical and biosocial anthropology. – 2008. – № 10. – С. 142-147
3. Гула Н.М. Вплив N-стеароїлетаноламіну на NO-синтазний шлях генерації оксиду азоту в аорті та серці щурів із стрептозотоциніндукованим діабетом / Н.М. Гула, Г.В. Косякова, А.Г. Бердишев // Укр. біохім. ж. – 2007. – Т. 79, № 5. – С. 153-158.
4. Мевх А.Т. Изучение эндопероксидпростагландинсинтетазы микросомной фракции тромбоцитов человека / А.Т. Мевх, В.В. Басевич, С.Д. Варфоломеев // Биохимия. – 1982. – Т. 47, № 10. – С. 1635-1639.
5. Мельник А.В. Активність ензимів синтезу гідрогенсульфіду в нирках щурів / А.В. Мельник, О.О. Пентюк // Укр. біохім. ж. – 2009. – Т. 81, № 4. – С. 12-22.
6. Роль активных форм кислорода в функциональной активности MAP-киназного каскада, глобальных факторов транскрипции и развитии апоптоза (обзор литературы и собственных исследований) / Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев, Е.Л. Левицкий [и др.] // Ж. Акад. мед. наук Украины. – 2008. – Т. 14, № 2. – С. 203-218.
7. Gender differences in the rennin-angiotensin and nitric oxide systems: relevance in the normal and diseased kidney / B.B. McGuire, R.W. Watson, F. Pqrez-Barriocanal [et al.] // Kidney Blood Press Res. – 2007. – Vol. 30, № 2. – P. 67-80.
8. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? / R. Wang // FASEB J. – 2002. – Vol. 16. – P. 1792-1798.
9. Acute nephrotoxicity of NSAID from the foetus to the adult / M. Musu, G. Finco R. [et al.] // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. – 2011. – Vol. 15, № 12. – P. 1461-1472.

СОСУДИСТЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ГЕНДЕРНЫХ РАЗЛИЧИЙ НЕФРОТОКСИЧНОСТИ ДИКЛОФЕНАКА У КРЫС

Н.И. Волощук

Резюме. В исследованиях *in vivo* показано преобладание активности ферментов-продуцентов вазодилатирующих молекул (простагландин-Н-синтазы, NO-синтазы, цистатионин-γ-лиазы) в почках самок крыс. В опытах *in vitro* установлено, что изолированные фрагменты почечной артерии самок в большей мере реагировали на H₂S-индуцированную релаксацию, чем самцов. Введение диклофенака снижало активности исследуемых ферментов и уменьшала вазорелаксирующие свойства H₂S у животных обоего пола, в большем мере у самцов.

Ключевые слова: гендерные различия, крысы, диклофенак, простагландин-Н-синтаза, NO-синтаза, цистатионин-γ-лиаза.

VASCULAR MECHANISMS OF FORMING GENDER DIFFERENCES OF DICLOPHENAC NEPHROTOXICITY IN RATS

N.I. Voloshchuk

Abstract. *In vivo* experiments have shown a predominance of the activity of enzymes-producers molecules (prostaglandin-H-synthase, NO-synthase, cystathionine γ-lyase) in the kidneys of females rats. In experiments *in vitro* it has been established, that isolated fragments of the renal artery of female rats reached more expressively to H₂S-induced relaxation, than those of males. The introduction of diclophenac reduced the activity of the enzymes under study and reduced the vasorelaxing action of H₂S in animals of both sexes, but to a greater extent in males.

Key words: gender differences, rats, diclophenac, prostaglandin-H-synthase, NO-synthase, cystathionine γ-lyase.

National M.I. Pirohov Memorial Medical University (Vinnytsia, Ukraine)

Рецензент – проф. І.І. Заморський

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 3 (63), part 2. – P. 73-76

Надійшла до редакції 14.08.2012 року