

УДК 577.015.047+577.158:615.245:547.461.4

# СОСТОЯНИЕ ПРО-АНТИОКСИДАНТНОГО ГОМЕОСТАЗА И МЕТАБОЛИЗМА ОКСИДА АЗОТА ПРИ СУБХРОНИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ПРОИЗВОДНОГО ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ

Кудря М. Я.<sup>1</sup>, Лалыменко О. С.<sup>1</sup>, Завгородний И. В.<sup>2</sup>, Мельниковская Н. В.<sup>1</sup>, Устенко Н. В.<sup>1</sup>, Шаламай А. С.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Государственное учреждение «Институт проблем эндокринной патологии имени В. Я. Данилевского Национальной академии медицинских наук Украины», г. Харьков

<sup>2</sup>Харьковский национальный медицинский университет

<sup>3</sup>Закрытое акционерное общество «Научно-производственный центр «Боршаговский химико-фармацевтический завод», г. Киев

*Введение.* Анализ данных литературы показал, что для повышения точности оценки риска влияния лекарственных средств (ЛС) на организм и надежности защиты здоровья работающих в соответствующем производстве, необходимо обоснование биологической предельно допустимой концентрации (БПДК) конкретного ЛС.

*Цель исследования* – определить критериальную значимость показателей обмена оксида азота, процессов липопероксидации и антиоксидантной защиты как биомаркеров эффекта сукцинатсодержащего антидиабетического средства при обосновании БПДК.

*Материалы и методы исследования.* Исследование проведено на 42 крысах-самцах, которым вводили водную эмульсию субстанции антидиабетического средства β-ФЭА-ОСАК внутривенно/30-кратно в дозе 100 мг/кг м. т. Исследовано состояние следующих процессов: пероксидного окисления липидов по уровню диеновых конъюгатов, гидроперекисей липидов и активных продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, антиоксидантной защиты по активности глутатионзависимых ферментов, а также активности каталазы и супероксиддисмутазы. Состояние метаболизма оксида азота оценивали по уровню нитрит/нитрат-анионов спектрофотометрическим методом с использованием реактива Грисса, активности NO-синтазы (с-NOS) кинетическим методом.

*Результаты.* В условиях субхронического введения субстанции β-ФЭА-ОСАК на начальных этапах отмечаются изменения в системе пероксидного окисления липидов и антиоксидантной защиты, носящие адаптационный характер, при удлинении срока эксперимента происходит активация некоторых реакций липопероксидации в крови и ткани печени, снижение активности суммарной NO-синтазы, продукции стабильных конечных метаболитов NO в плазме крови, моче и ткани печени животных.

*Выводы.* Определены биомаркеры эффекта данного соединения, которые могут быть использованы при обосновании БПДК.

**Ключевые слова:** антидиабетическое средство, про-антиоксидантный гомеостаз, оксид азота

## Введение

В современных условиях динамического развития химико-фармацевтической промышленности особую актуальность представляют вопросы внедрения комплексных научных подходов токсиколого-гигиенической оценки безопасности производства лекарственных средств (ЛС).

В условиях промышленного производства ЛС и их активные компоненты часто являются потенциально опасными для здоровья работающих, поскольку могут инициировать различные по проявлениям дозо-время-зависимые функциональные нарушения или патологические процессы [1]. При

этом ведущим неблагоприятным производственным фактором в фармацевтической отрасли является загрязнение воздуха рабочей зоны аэрозолями органических и неорганических химических соединений сырья, промежуточных и конечных продуктов синтеза ЛС на разных стадиях технологического процесса [2].

Повышенный интерес со стороны гигиенистов в последние годы вызывают такие ЛС, которые при их промышленном производстве могут оказывать влияние на основные звенья нормально функционирующей эндокринной системы работающего контингента, а именно: синтез, секрецию, транспорт, связывание, элиминацию естественных гормонов.

Кроме того, известно, что многим ЛС присущ плейотропный профиль биологического/токсического действия на организм даже в малых дозах [3].

Для ограничения контакта с такими потенциально опасными веществами в условиях производства необходима разработка гигиенических регламентов их содержания как в воздухе производственных помещений, так и в биосредах работающего контингента. Такие исследования предусматривают прогнозирование риска их неблагоприятного действия с установлением приоритетных критериев неблагоприятного влияния ЛС на организм, иными словами, определение биомаркеров эффекта, которые отличаются высокой диагностической чувствительностью, информативностью и селективностью [4].

Установление биомаркеров эффекта, которые характеризуют состояние функционально-метаболических систем организма, принимающих участие в формировании адапционных реакций в ответ на воздействие какого-либо химического агента, способствует проведению биологического контроля за состоянием здоровья работающих для определения реального риска при контакте с ЛС.

Биомониторинг влияния ЛС в условиях производства предусматривает установление взаимосвязи между уровнем токсиканта в воздухе рабочей зоны и его содержанием в биосубстратах работающих, то есть использование так называемых тестов экспозиции [5].

В связи с этим, для повышения точности оценки риска влияния ЛС на организм и надежности защиты здоровья работающих в соответствующем производстве, необходимо обоснование биологической предельно допустимой концентрации (БПДК) конкретного ЛС. БПДК характеризует уровень исследуемого ЛС в биосубстратах работающих, при котором в течение непосредственного контакта с ЛС или в отдаленные сроки жизни не возникает отклонений в состоянии здоровья работающих [6]. Кроме этого, БПДК позволяет оценивать индивидуально поглощенную дозу ЛС, выявлять лиц с повышенным риском, своевременно разрабатывать и проводить необходимые профилактические, организационные и лечебные мероприятия. В период интеграции страны в европейскую экономическую систему приоритетным направлением профилактической медицины является гармонизация критериев гигиенического регламентирования химических факторов, в том числе и ЛС, а также

методов их химического и биологического контроля в соответствии с концепцией ВОЗ, МОТ и ЕС [7].

Выбранное для исследования оригинальное сукцинатсодержащее антидиабетическое средство  $\beta$ -фенилэтиламид 2-оксисукциниловой кислоты —  $\beta$ -ФЭА-ОСАК, синтезированное в ГУ «Институт проблем эндокринной патологии имени В. Я. Данилевского НАМН Украины» (г. Харьков), обладает антигипергликемической, антиоксидантной активностью, влияет на ключевые патогенетические звенья сахарного диабета на ранних стадиях его развития, снижает риск сосудистых осложнений. Установлено, что одним из молекулярных механизмов его антидиабетического действия является угнетение оксидативного стресса в сочетании с активацией биоэнергетических процессов [8]. В настоящее время ведется активная работа по организации его промышленного выпуска на одном из отечественных предприятий.

Установлено, что одним из универсальных патогенетических механизмов неблагоприятного действия на организм большинства ксенобиотиков, в том числе ЛС, является активация свободнорадикальных процессов. Избыток активных форм кислорода и других свободнорадикальных продуктов способствует стимуляции реакций пероксидной модификации биомолекул, что сопровождается нарушением целостности клеточных биомембран, изменением энзимного профиля и дезорганизацией метаболических процессов, способствует развитию различных патологических процессов в организме [9]. В связи с этим показатели окислительно-антиоксидантного гомеостаза используют как один из ранних и информативных критериев мониторинга и прогнозирования токсического повреждения клеток и тканей.

Как известно, монооксид азота NO имеет широкий спектр биорегуляторного действия и при этом является универсальным медиатором межклеточного взаимодействия, координируя взаимосвязи энзимов системы антиоксидантной защиты, модулируя межзвеньевые коммуникации свободнорадикальных преобразований [10]. Следует отметить, что согласованная работа окислительно-восстановительных реакций, непосредственно зависящих от состояния метаболизма оксида азота, может изменяться под влиянием отдельных химических соединений, в том числе и ЛС.

В связи с вышеизложенным изучение состояния пероксидного окисления липидов (ПОЛ), антиокси-

дантной защиты (АОЗ) и метаболизма NO направлено на выявление первичных нарушений и возможных пусковых механизмов неблагоприятного воздействия данного антидиабетического средства.

*Цель исследования* — определить критериальную значимость показателей обмена оксида азота, процессов липопероксидации и антиоксидантной защиты как биомаркеров эффекта сукцинатсодержащего антидиабетического средства при обосновании биологической ПДК.

## Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 42 половозрелых, нелнейных крысах-самцах массой 200–240 г, содержащихся в условиях вивария в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных» (Украина, 2001 г.) на обычном сбалансированном рационе и свободном доступе к воде [11]. Подопытным животным вводили водную эмульсию субстанции  $\beta$ -ФЭА-ОСАК внутрижелудочно/30-кратно в дозе 100 мг/кг м. т., что в 4 раза выше экспериментально установленной эффективной дозы. Контрольная группа животных получала внутрижелудочно водную эмульсию с твин-80.

Для проведения биохимических исследований использовали биосубстрат экспериментальных животных: кровь, плазму, сыворотку крови, ткань печени. Состояние процессов свободнорадикального ПОЛ изучали по содержанию диеновых конъюгатов, гидроперекисей липидов (ГПЛ) и активных продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКАС), в сыворотке крови, цельной крови и гомогенате печени [12–14]; антиоксидантный статус организма животных оценивали по активности глутатионзависимых ферментов — глутатионредуктазы (ГР) (КФ 1.6.4.2), глутатионпероксидазы (ГП) (КФ 1.11.1.9), глутатионтрансферазы (ГТ) (КФ 2.5.1.18) в гемолизате эритроцитов и гомогенате печени [15]. Определяли каталазную активность (КФ 1.11.1.6) сыворотки крови и гомогената печени, активность супероксиддисмутазы (СОД) (КФ 1.15.1.1) в гомогенате печени [16–17]. Вместе с этим изучали состояние метаболизма оксида азота по уровню нитрит/нитрат-анионов в плазме крови, моче и гомогенате печени спектрофотометрическим методом с использованием реактива Грисса, активности NO-синтазы (с-NOS) (КФ 1.14.13.19) в гомогенате печени кинетическим методом по скорости окисления

НАДФН<sup>+</sup>Н<sup>+</sup> в реакционной смеси [18–19]. Для расчета активности ферментов в гемолизате эритроцитов и гомогенате печени определяли концентрацию общего гемоглобина и содержание протеина по методу Бредфорда [20].

Нормальность распределения в рядах определяли по критерию Шапиро-Уилка (W). Для парного сравнения показателей подопытной группы с интактным контролем использовали критерий Стьюдента. Фактический материал обрабатывали с помощью пакета программного обеспечения StatSoft 10 [21].

## Результаты исследования и их обсуждение

При изучении состояния процессов ПОЛ установлено, что на начальных этапах применения (5 введений) субстанции  $\beta$ -ФЭА-ОСАК в дозе 100 мг/кг м. т. у подопытной группы животных достоверно повышался уровень ТБКАС крови по сравнению с контролем при отсутствии изменений интенсивности других окислительных реакций каскадного процесса (табл. 1).

В гомогенате печени крыс при данных условиях экспозиции, наоборот, отмечали снижение уровней промежуточных и конечных продуктов деградации жирных кислот ГПЛ и ТБКАС ( $p < 0,05$ ). Отмеченные изменения показателей ПОЛ, по-видимому, связаны с повышением активности каталазы сыворотки крови и СОД в ткани печени ( $p < 0,05$ ), то есть, активацией первого этапа ферментативного пути антиоксидантной защиты, что в свою очередь препятствует накоплению высокорекреакционных и токсичных продуктов липопероксидации.

После 15 и 30 дней воздействия изучаемого соединения у подопытной группы животных по сравнению с контролем наблюдали некоторую интенсификацию промежуточных и конечных реакций ПОЛ, проявляющуюся в виде повышения уровня ГПЛ в сыворотке крови ( $p < 0,05$ ) после 15 дней воздействия и увеличения содержания ТБКАС в печени в конце эксперимента. Данные изменения в состоянии процессов липопероксидации после 15 дней введения соединения вероятно связаны со снижением активности ГП гемолизата эритроцитов ( $p < 0,05$ ). Известно, что ГП — фермент второй линии антипероксидной защиты, который имеет высокое сродство с перекисью водорода и катализирует инактивацию перекисей с помощью окисления глутатиона [10]. Падение его активности на

Таблиця 1

Некоторые показатели пероксидного окисления липидов/антиоксидантной защиты у крыс в условиях субхронического внутрижелудочного введения субстанции  $\beta$ -ФЭА-ОСАК ( $\bar{X} \pm S\bar{X}$ )

Показатель	п	Контроль	п	$\beta$ -ФЭА-ОСАК
<b>5 дней введения</b>				
ТБКАС <sup>3)</sup> :				
– кровь, мкмоль/мл	6	0,49 $\pm$ 0,02	6	0,61 $\pm$ 0,03 <sup>1)</sup>
– печень, мкмоль/г	7	67,6 $\pm$ 3,8	6	53,8 $\pm$ 2,3 <sup>1)</sup>
Гидроперекиси липидов:				
– сыворотка, мкмоль/л	7	5,02 $\pm$ 0,8	7	5,0 $\pm$ 0,7
– печень, мкмоль/г тк	7	124,5 $\pm$ 4,3	6	93,4 $\pm$ 3,3 <sup>1)</sup>
Активность каталазы:				
– сыворотка, мкат H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /л;	6	1,20 $\pm$ 0,05	7	2,17 $\pm$ 0,18 <sup>1)</sup>
– печень, мкат H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /г тк./мин	7	24,7 $\pm$ 1,6	7	22,7 $\pm$ 1,5
СОД печень, усл. ед./мг тк.	6	83,4 $\pm$ 12,0	6	141,3 $\pm$ 23,2 <sup>1)</sup>
<b>15 дней введения</b>				
Гидроперекиси липидов:				
– сыворотка, мкмоль/л	7	2,50 $\pm$ 0,15	6	3,6 $\pm$ 0,51 <sup>1)</sup>
– печень, мкмоль/г тк.	7	116,7 $\pm$ 3,8	7	101,3 $\pm$ 8,9
СОД печень, усл. ед./мг тк.	7	115,8 $\pm$ 9,2	7	78,0 $\pm$ 9,0 <sup>1)</sup>
Глутатионпероксидаза эритроцитов, мкмоль GSSG <sup>4)</sup> /г Hb · мин.	6	107,2 $\pm$ 5,6	6	35,3 $\pm$ 3,9 <sup>1)</sup>
<b>30 дней введения</b>				
ТБКАС <sup>3)</sup> :				
– кровь, мкмоль/мл	7	0,69 $\pm$ 0,04	7	0,66 $\pm$ 0,017
– печень, мкмоль/г	7	57,3 $\pm$ 1,2	7	67,2 $\pm$ 2,0 <sup>1)</sup>
Глутатионредуктаза эритроцитов, мкмоль НАДФН/г Hb · мин	7	2,23 $\pm$ 0,22	7	3,1 $\pm$ 0,17 <sup>1)</sup>
Глутатионпероксидаза эритроцитов, мкмоль GSSG <sup>4)</sup> /г Hb · мин.	7	130,4 $\pm$ 9,1	7	107,2 $\pm$ 8,7 <sup>2)</sup>

Примечание. <sup>1)</sup>Отклонение статистически достоверно, ( $p < 0,05$ ); <sup>2)</sup>отклонение статистически близко к достоверному, ( $0,05 < p < 0,10$ ); <sup>3)</sup>ТБКАС – активные соединения, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой; <sup>4)</sup>GSSG – глутатион окисленный.

фоне снижения активности СОД в ткани печени ( $p < 0,05$ ) создает условия для запуска каскада реакций ПОЛ.

При удлинении срока экспозиции до 30 дней у подопытных животных в сравнении с контролем в гемолизате эритроцитов отмечается усиление активности ГР – флавинового фермента класса оксидоредуктаз, который имеет высокую специфичность к глутатиону [22]. Возможно это компенсаторный механизм, который предупреждает истощение резервов восстановленного глутатиона и препятствует нарушению тиол-дисульфидного равновесия в условиях ослабления ферментативной антипероксидной защиты.

Таким образом, при субхроническом внутрижелудочном введении субстанции  $\beta$ -ФЭА-ОСАК наблюдаются разновекторные изменения в процес-

сах липопероксидации, что проявляется замедлением каскадных реакций в начале эксперимента и незначительным повышением содержания ТБКАС в конце эксперимента.

Анализируя состояние обмена оксида азота установлено, что в условиях 5-дневной экспозиции  $\beta$ -ФЭА-ОСАК у подопытных крыс снижается активность с-NOS гомогената печени ( $p < 0,05$ ), что в свою очередь сказывается на метаболизме NO, отражением чего является снижение уровня его стабильных конечных метаболитов в плазме крови крыс ( $p < 0,05$ ) (табл. 2). Вместе с тем, в моче и гомогенате печени крыс концентрации  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  статистически не отличались от значений данных показателей у контрольных животных, несмотря на угнетение активности с-NOS (табл. 2).

Таблиця 2

Некоторые показатели метаболизма оксида азота в условиях субхронического внутрижелудочного введения  $\beta$ -ФЭА-ОСАК ( $\bar{X} \pm S\bar{x}$ )

Показатель	n	Контроль	n	$\beta$ -ФЭА-ОСАК
<b>5 дней введения</b>				
Нитрит-анион ( $\text{NO}_2^-$ ):				
– плазма крови, мкмоль/л	7	$6,36 \pm 0,70$	7	$4,11 \pm 0,70^{1)}$
– моча, мкмоль/л	6	$9,90 \pm 0,31$	7	$8,70 \pm 0,65$
– печень, нмоль/мг протеина	7	$32,40 \pm 0,95$	7	$29,9 \pm 1,9$
Нитрат-анион ( $\text{NO}_3^-$ ):				
– плазма крови, мкмоль/л	7	$23,9 \pm 2,1$	7	$16,9 \pm 2,2^{1)}$
– моча, мкмоль/л	6	$58,6 \pm 1,4$	7	$53,0 \pm 2,9$
– печень, нмоль/мг протеина	7	$55,50 \pm 0,74$	7	$53,2 \pm 2,6$
Активность NOS <sup>3)</sup> ( $V_{\max}$ ), нмоль НАДФН/ мг протеина · мин	7	$4,38 \pm 0,70$	7	$2,4 \pm 0,3^{1)}$
<b>15 дней введения</b>				
Нитрит-анион ( $\text{NO}_2^-$ ):				
– плазма крови, мкмоль/л	7	$5,90 \pm 0,44$	7	$3,80 \pm 0,54^{1)}$
– моча, мкмоль/л	7	$9,6 \pm 1,5$	7	$6,3 \pm 0,5^{2)}$
– печень, нмоль/мг протеина	7	$29,8 \pm 3,4$	7	$22,7 \pm 1,9^{2)}$
Нитрат-анион ( $\text{NO}_3^-$ ):				
– плазма крови, мкмоль/л	7	$23,3 \pm 1,4$	7	$16,8 \pm 1,7^{1)}$
– моча, мкмоль/л	7	$57,1 \pm 7,1$	7	$42,6 \pm 2,4^{2)}$
– печень, нмоль/мг протеина	7	$46,8 \pm 3,5$	7	$39,1 \pm 3,2$
Активность NOS <sup>3)</sup> ( $V_{\max}$ ), нмоль НАДФН/ мг протеина · мин.	7	$3,90 \pm 0,44$	7	$3,80 \pm 0,33$
<b>30 дней введения</b>				
Нитрит-анион ( $\text{NO}_2^-$ ):				
– плазма крови, мкмоль/л	7	$7,4 \pm 1,1$	7	$4,30 \pm 0,54^{1)}$
– моча, мкмоль/л	7	$8,40 \pm 0,83$	7	$5,40 \pm 0,64^{1)}$
– печень, нмоль/мг протеина	7	$30,6 \pm 2,6$	7	$23,8 \pm 1,6^{1)}$
Нитрат-анион ( $\text{NO}_3^-$ ):				
– плазма крови, мкмоль/л	7	$24,7 \pm 3,1$	7	$16,0 \pm 1,5^{1)}$
– моча, мкмоль/л	7	$51,7 \pm 2,4$	7	$38,1 \pm 2,8^{1)}$
– печень, нмоль/мг протеина	7	$53,7 \pm 3,2$	7	$44,1 \pm 1,8^{1)}$
Активность NOS <sup>3)</sup> ( $V_{\max}$ ), нмоль НАДФН/ мг протеина · мин	7	$3,9 \pm 0,4$	7	$2,8 \pm 0,1^{1)}$

Примечание. <sup>1)</sup>Отклонение статистически достоверно, ( $p < 0,05$ ), <sup>2)</sup>отклонение статистически близко к достоверному, ( $0,05 < p < 0,10$ ), <sup>3)</sup>c-NOS – синтаза оксида азота.

Известно, что показатели экскреции  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  являются суммарными величинами, отражающими интенсивность синтеза NO эндотелием сосудов, включая и почечную паренхиму [11]. Кроме этого, нельзя исключить и возможность последовательного восстановления  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  эндотелием почек благодаря нитрит/нитратредуктазным реакциям.

После 15 дней введения субстанции  $\beta$ -ФЭА-ОСАК у животных зафиксировано падение уровней  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  в плазме крови ( $p < 0,05$ ), снижение

скорости их выведения с мочой ( $0,05 < p < 0,10$ ), а также уменьшение уровня нитритов ( $0,05 < p < 0,10$ ) в ткани печени.

Снижение концентраций  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  в плазме крови при неизменной экспрессии суммарной NO-синтазы возможно связано с ингибированием внутрисосудистых альтернативных путей синтеза  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ , в частности, при участии нитритредуктазы и ксантиноксидазы. Известно, что нитрит-анион запускает образование большого количества NO в ткани печени и сердце по принципу обратной связи,

но в крови образуются только следовые количества [23]. В то же время замедление темпов мочевого экскреции  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  может быть связано с усилением реабсорбции анионов в канальцевом отделе нефрона, которое направлено на сохранение физиологических констант этих анионов в плазме крови. Вместе с тем, незначительные сдвиги концентраций нитрит/нитрат анионов в ткани печени, очевидно, обусловлены высокой резервно-адаптационной возможностью органа и цикличностью метаболизма NO.

В конце эксперимента после 30 дней экспозиции у животных подопытной группы по сравнению с контролем зарегистрировано падение NO-синтазной активности, снижение концентраций эндогенных  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  плазмы крови, мочи и ткани печени ( $p < 0,05$ ). Уменьшение содержания  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  в плазме крови может быть вызвано не только снижением NO-синтазной активности, но и взаимодействием NO с протеинами и низкомолекулярными соединениями, содержащими в активном центре ионы переменных металлов [11]. Учитывая тесную связь между активностью с-NOS и плазменными концентрациями  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ , темпами их мочевого экскреции и печеночным пулом этих анионов, отмеченное снижение их концентраций в плазме крови, моче и ткани печени закономерно и в целом отражает скорость биосинтеза NO под влиянием данного соединения.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что  $\beta$ -ФЭА-ОСАК в условиях внутрижелудочного поступления в организм животных изменяет выраженность метаболических преобразований отдельных звеньев оксидозотного гомеостаза.

Таким образом, изменения уровня ТБКАС гомогената печени, активности глутатионпероксидазы

гемолизата эритроцитов, с-NOS гомогената печени и уровней  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  плазмы крови можно расценивать как биомаркеры эффекта в условиях внутрижелудочного поступления  $\beta$ -ФЭА-ОСАК и использовать их при проведении биологического контроля производственного влияния данного соединения и обосновании биологической ПДК.

## Выводы

1. Субхроническое внутрижелудочное введение субстанции  $\beta$ -фенилэтиламида 2-оксисукциниловой кислоты в дозе 100 мг/кг м. т. на начальных этапах эксперимента вызывает разнонаправленные сдвиги в системе ПОЛ и повышение активности ферментов первой линии антиоксидантной защиты (СОД гомогената печени и каталазы сыворотки крови), в середине и конце срока наблюдения отмечается незначительное ускорение отдельных реакций липопероксидации в сыворотке крови и ткани печени.
2. Установлено, что внутрижелудочное введение  $\beta$ -ФЭА-ОСАК приводит к снижению активности NO-синтазы, продукции стабильных конечных метаболитов NO в плазме крови, моче и ткани печени.
3. Определены биомаркеры эффекта  $\beta$ -ФЭА-ОСАК (уровень ТБКАС и активность с-NOS гомогената печени, активность ГП гемолизата эритроцитов и концентрации  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  плазмы крови), которые могут быть использованы как лимитирующие критерии при обосновании биологической предельно допустимой концентрации данного ЛС.

## Литература

1. Трахтенберг И. М. Приоритетные аспекты экспериментальных исследований лекарственных средств / И. М. Трахтенберг, Н. В. Кокшарева, Ю. И. Лобода // Сучасні проблеми токсикології. – 2003. – № 1. – С. 1–8.
2. Черкащенко О. С. Токсиколого-гигиеническая характеристика триазавирина (натрия 7-метилтио-3-нитро-4-оксо-1,4-дигидро[1,2,4] триазоло [5,1-с] [1,2,4] триазин-1-ид дигидрата) : автореф. дис. на соискание научн. степени кандидата мед. наук : 14.03.04 / Черкащенко Ольга Сергеевна; Санкт-Петербург: ФГУН ин-т токсикологии. – Санкт-Петербург, 2012. – 21 с.
3. Бардик Ю. В. Еколого-гігієнічні та токсикологічні проблеми життєдіяльності людини. Ліки як полютанти довкілля / Ю. В. Бардик, О. О. Бобильова, Л. І. По-

вякель // Сучасні проблеми токсикології. – 2005. – № 4. – С. 20–26.

4. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA) // Toxicology letters. – 2010. – V. 192. – P. 3–16

5. Methodology for the Derivation of Occupational Exposure Limits: Key Documentation : official text : [Scientific Committee on Occupational Exposure Limits, June 2013]. – European commission, 2013. – 38 p.

6. Биологический контроль производственного воздействия вредных веществ: метод, рекомендации № 5205-90 / М-во здравоохранения СССР [авт. И. В. Саноцкий и др.]. – Москва, 1990. – 30 с.

7. Harmonization Project Document No. 8. Human health risk assessment toolkit: Chemical hazards: official text : [World Health Organization, 2010]. – WHO. – 2010. – 74 p.

8. Горбенко Н. І. Патогенетичне обґрунтування ефективності похідного янтарної кислоти – фенсукциналу в терапії цукрового діабету та його судинних ускладнень (експериментальне дослідження) : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора біол. наук : 14.01.14 / Горбенко Наталія Іванівна; *Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського АМН України*. – Харків, 2004. – 36 с.

9. Горожанская Э. Г. Свободнорадикальное окисление и механизмы антиоксидантной защиты в нормальной клетке и при опухолевых заболеваниях / Э. Г. Горожанская // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2010. – № 6. – С. 28–44.

10. Покровский В. И. Оксид азота, его физиологические и патофизиологические свойства / В. И. Покровский, Н. А. Виноградов // *Терапевтический архив*. – 2005. – № 1. – С. 82–97.

11. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // *Ендокринологія*. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142–145.

12. Плацер З. Определение диеновых конъюгатов и общих гидроперекисей в биологических материалах / З. Плацер, М. Видлакова, Л. Купила // *Чехосл. мед. обзор*. – 1970. – Т. 16, № 1. – С. 30–34.

13. Asakawa T. Colorings conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides / T. Asakawa, T. Matsushite // *Lipids*. – 1980. – V. 15. – P. 137–140.

14. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаршвили // *Соврем. методы в биохимии*. – Москва, 1977. – С. 66–68.

15. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма : метод.

рекомендации / Рос. Акад. мед. наук ; [авт. А. В. Арутюнян и др.]. – Санкт-Петербург, 2000. – С. 76.

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

17. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // *Лаб. дело*. – 1988. – № 1. – С. 16–19.

18. Фотометрический метод определения нитратов и нитритов в биологических жидкостях (инструкция по применению) : утв. М-вом здравоохранения республики Беларусь 19.03.01. – Витебск : [Б.и.], 2001. – 9 с.

19. Сумбаев В. В. Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс / В. В. Сумбаев, И. М. Ясинская // *Соврем. пробл. токсикологии*. – 2000. – № 3. – С. 3–7.

20. Гаспаров В. С. Определение белка по связыванию с красителем Кумасси бриллиантовым голубым G-250 / В. С. Гаспаров, В. Г. Дегтярь // *Биохимия*. – 1994. – Т. 59, вып. 6. – С. 763–775.

21. Пакет програмного забезпечення для статистичного аналізу StatSoft Statistic 10.

22. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при воздействии органических растворителей в производстве / Р. Ф. Камиллов, Т. В. Ханов, В. П. Кудрявцев, Д. Ф. Шакиров // *Клин. лаб. диаг.* – 2009. – № 1. – С. 9–13.

23. Сибірна Н. О. Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах / Н. О. Сибірна, М. Я. Люта, Н. І. Климишин // *Біологічні студії*. – 2010. – Т. 4, № 1. – С. 143–160.

**Кудря М. Я.<sup>1</sup>, Лалименко О. С.<sup>1</sup>, Завгородній І. В.<sup>2</sup>, Мельниківська Н. В.<sup>1</sup>,**

**Устенко Н. В.<sup>1</sup>, Шаламай А. С.<sup>3</sup>**

## **СТАН ПРО-АНТИОКСИДАНТНОГО ГОМЕОСТАЗУ ТА МЕТАБОЛІЗМУ ОКСИДУ АЗОТУ ПРИ СУБХРОНІЧНОМУ ВПЛИВІ ПОХІДНОГО ЯНТАРНОЇ КИСЛОТИ**

<sup>1</sup>Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології імені В. Я. Данилевського Національної академії медичних наук України», м. Харків

<sup>2</sup>Харківський національний медичний університет

<sup>3</sup>Закрите акціонерне товариство «Науково-виробничий центр «Боршагівський хіміко-фармацевтичний завод», м. Київ

*Вступ.* Аналіз даних літератури показав, що для підвищення точності оцінки ризику впливу лікарських засобів (ЛЗ) на організм та надійності захисту здоров'я працюючих на відповідному виробництві необхідно обґрунтування біологічної гранично допустимої концентрації (БГДК) конкретного ЛЗ.

*Мета дослідження* – визначити критеріальну значущість показників обміну оксиду азоту, процесів ліпопероксидації та антиоксидантного захисту як біомаркерів ефекту сукцинатвмісного антидіабетичного засобу при обґрунтуванні БГДК.

*Матеріали та методи дослідження.* Дослідження проведено на 42 щурах-самцях, яким вводили водну емульсію субстанції антидіабетичного засобу β-ФЕА-ОСАК внутрішньошлунково/30-разово в дозі 100 мг/кг м. т. Досліджено стан наступних процесів: пероксидного окиснення ліпідів по рівню дієнових кон'югатів, гідроперекисей ліпідів та активних продуктів, що реагують з тиобарбітуровою кислотою, антиоксидантного захисту по активності глутатіонзалежних ферментів, а також активності каталази та супероксиддисмутази. Стан метаболізму оксиду азоту

оцінювали по рівню нітрит/нітрат-аніонів спектрофотометричним методом з використанням реактиву Грися, активності NO-синтази (с-NOS) кінетичним методом.

**Результати.** За умов субхронічного введення субстанції  $\beta$ -ФЕА-ОСАК на початкових етапах відзначаються зміни в системах пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту, які мають адаптаційний характер, при подовженні терміну експерименту відбувається активація деяких реакцій ліпопероксидації в крові та тканині печінки, зниження активності сумарної NO-синтази, продукції стабільних кінцевих метаболітів NO в плазмі крові, сечі та тканині печінки тварин.

**Висновки.** Визначено біомаркери ефекту даної сполуки, які можуть бути використані при обґрунтуванні БГДК.

**Ключові слова:** антидіабетичний засіб, про-антиоксидантний гомеостаз, оксид азоту

**Kudrya M. Ya.<sup>1</sup>, Lalimenko O. S.<sup>1</sup>, Zavgorodnii I. V.<sup>2</sup>, Melnikovskaya N. V.<sup>1</sup>, Ustenko N. V.<sup>1</sup>, Shalamay A. S.<sup>3</sup>**

## **THE STATE OF PRO-ANTIOXIDANT HOMEOSTASIS AND METABOLISM OF NITRIC OXIDE UNDER A SUBCHRONIC EFFECT OF SUCCINIC ACID DERIVATIVE**

<sup>1</sup>V.Y. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems, NAMS of Ukraine, Kharkiv

<sup>2</sup>Kharkiv National Medical University

<sup>3</sup>PJSC SIC «Borshchahivskiy CPP», Kiev

**Introduction.** The analysis of literature showed that in order to improve the accuracy of risk assessment of drugs' impact on the human body and reliability of workers' protection in the corresponding production it is necessary to ground a biological maximum permissible concentration (BMPC) of a specific drug.

**Purpose of the study.** To define a criterion value of the nitric oxide exchange, lipid peroxidation and antioxidant protection as biomarkers of the effect of a succinate-containing antidiabetic agent, when grounding a biologically maximum permissible concentration.

**Materials and methods.** Experiments were conducted on 42 male rats, which received an aqueous emulsion of an antidiabetic agent, derivative of succinic acid  $\beta$ -PhEA-OSA, intragastric - 30 times, in the dose of 100 mg. The state of processes: lipid peroxide oxidation by the level of diene conjugates, lipid hydroperoxides and active products, reacting with thiobarbituric acid, antioxidant protection by enzymes glutathione activity as well as catalase and superoxide dismutase activities. The state of nitric oxide metabolism was evaluated by the level of nitrite / nitrate anions with a spectrophotometry method, using a Griess reagent and activity of NO-synthase (с-NOS) by a kinetic method.

**Results.** In conditions of a subchronic administration of  $\beta$ -PhEA-OSA substance the changes in the system of lipid peroxidation and antioxidant protection were observed at early stages, which were of an adaptive character. When lengthening the term of the experiment an activation of certain lipid peroxidation reactions in the blood and liver tissue was taken place as well as the decrease in the activity of the total of NO-synthase, products of stable terminal NO metabolites in blood plasma, urine and liver tissue of animals.

**Conclusions.** The biomarkers of the effect of the mentioned compound have been defined, which can be used for grounding biologically maximum permissible concentrations.

**Key words:** antidiabetic drug, pro-antioxidant homeostasis, nitrogen oxide

## **References**

1. Trakhtenberg, I. M., Kokshareva, N. V., Loboda, Ju. I. 2003, «Priority aspects of experimental investigations on medicines». Modern problems of toxicology, no. 1, pp. 1–10 (in Russian).
2. Cherkashchenko, O. S. 2012, Toxicological and hygienic characteristics of triazavirin (sodium 7-methylthio-3-nitro-4-oxo-1,4-dihydro- [1,2,4] triazolo [5,1-c] [1,2,4] triazin-1-1-id dihydrate). Thesis, Candidate of Medical Sciences: 14.03.04 ; Institute of toxicology of Russia. Sankt- Peterburg, 22 p. (in Russian).
3. Bardik, Y. V., Povyakel, L. I., Boblyyova, O. A. 2005, «Ecological-hygienic and toxicological problems of human vital activity. Drugs as environmental pollutants». Modern problems of toxicology, no. 4, pp. 20–26 (in Ukrainian).
4. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA) 2010, Toxicology letters, no. 192, pp. 3–16.
5. Methodology for the Derivation of Occupational Exposure Limits, 2013, Key Documentation : an official text, Scientific Committee on Occupational Exposure Limits, European Commission, 38 p.
6. Sanotsky, I. V. 1990, Biological control of exposure to occupational harmful substances, Methodical recommendations, № 5205-90, MH of the USSR, 30 p. (in Russian).
7. Harmonization Project Document No. 8, 2010, WHO human health risk assessment toolkit: Chemical hazards: an official text, World Health Organization, WHO, 74 p.



8. Gorbenko, N. I. 2004, Pathogenic substantiation of the efficiency of succinic acid derivative – phensuccinal in the therapy of diabetes mellitus and its vessel complications (an experimental study), Thesis, Doctor of Biol. Sciences: 14.01.14, V. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems of AMS of Ukraine, 36 p. (in Ukrainian)
9. Gorozhanskaya, E. G. 2010, «Free radical oxidation and mechanisms of antioxidant defense in a normal cell and in tumor diseases», Clinical Laboratory Diagnostics, no. 6, pp. 28–41 (in Russian).
10. Pokrovskiy, V. I., Vinogradov, N. A. 2005, «Nitric oxide and its physiological and pathophysiological properties», Ther. Arch., no. 1, pp. 82–87 (in Russian).
11. General ethic principles of experiments on animals, 2003, Endocrinology, V. 8, no.1, pp. 142–145 (in Ukrainian).
12. Platzer, Z., Vydlakova, M., Kupila, L. 1970, «Detection of dienic conjugates and general hydroperoxides in biological samples», Czechoslovak. Med.Survey, v. 16, no.1, pp. 30–34 (in Russian).
13. Asakawa, T., Matsushite, T. 1980, «Colorings conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides», Lipids, no.15, pp. 137–140.
14. Stalnaya, I. D., Garishvili, T. G. 1977, «Method of definition of Malonic Aldehyde, using hiobarbituric acid», Modern Methods in Biochemistry, no. 1, pp. 66–68 (in Russian).
15. Arutyunyan, A. V., Dubinina, E. E., Zybina, N. N. 2000, Methods of estimating a free-radical oxidation and anti-oxidant system in the body, Method. recommen., Russ. Acad. Med. Sci. 104 p. (in Russian).
16. Misheneva, V. S., Goryukhina, T. A. 1968, «Presence of Glutathione in the normal and tumor tissues in animals and humans», Voprosy Onkologii, v. 14, no.10, pp. 46–49 (in Russian).
17. Korolyuk, M. A., Ivanova, L. I., Tokarev, V. E. 1988, «Method of detection of Catalase activity», Labor. Delo, no. 1, pp. 16–19 (in Russian).
18. Photometric method of defining nitrites and nitrates in biological liquids 2001, (Instruction for use), Approved, Ministry of Public Health of Belarus Rep., Vitebsk, 9 p. (in Russian).
19. Sumbayev, V. V., Yasinskaya, I. M. 2000, «Effect of DDT on synthase activity of nitric oxide in the rat liver, lungs and brain», Modern Probl. Toxicol., no. 3, pp. 3–7 (in Russian).
20. Gasparov, V. S., Degtyar, V. G. 1994, «Detection of protein by its linkage to Kumassi Diamond light-blue G-250 dye», Biochem., v. 59, no. 6, pp. 763–775 (in Russian).
21. Software package for the statistical analysis - Statistic 10.
22. Kamilov, R. F., Khanov, T. V., Kudryavtsev, V. P., Shakirov, D. F. 2009, «Free radical oxidation and antioxidant defense in exposure to organic solvents in production», Clinical Laboratory Diagnostics, no. 1, pp. 9–13 (in Russian).
23. Sybirna, N. O., Lyuta, V. Ya., Klymyshyn, N. I. 2010, «Molecular mechanisms of nitric oxide deposition in erythrocytes», Biol. Studii, v. 4, no. 10, pp. 143–160 (in Ukrainian).

*Поступила: 10 июня 2016 г.*

**Контактное лицо:** Кудря Мария Яковлевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория токсикологии и гигиенического регламентирования лекарственных средств, ГУ «Институт проблем эндокринной патологии имени В. Я. Данилевского НАМН Украины», д. 10, ул. Алчевских (Артема), г. Харьков, 61002. Тел.: + 38 0 57 343 89 95. Электронная почта: lab-tox@ukr.net