

УДК 577.015.047+577.158:615.245:547.461.4

О.С. Лалименко, І.А. Палагіна, М.Я. Кудря, Н.В. Мельниківська

*ДУ «Інститут проблем ендокринної патології
ім. В.Я. Данилевського НАМН України», м. Харків*

ВПЛИВ β -ФЕНІЛЕТИЛСУКЦИНАМІДУ НА МЕТАБОЛІЗМ ОКСИДУ АЗОТУ І СТАН ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У ЩУРІВ

Досліджено субхронічний вплив β -фенілетилсукцинамиду, метаболіту антидіабетичного засобу – похідного янтарної кислоти, на обмін оксиду азоту, стан вільнорадикальних процесів та антиоксидантного захисту у щурів. Встановлено, що дана сполука викликає зниження активності NO-синтази, рівня кінцевих метаболітів NO та ступеня окисної модифікації білків, але водночас підвищує активність глутатіонової системи. З утворенням в організмі цього метаболіту може бути пов'язана антиокислювальна дія самого лікарського засобу при його цільовому застосуванні.

Ключові слова: β -фенілетилсукцинамід, оксид азоту, вільнорадикальні процеси, антиоксидантний захист.

Останніми роками накопичено нові дані щодо етіопатогенезу цукрового діабету (ЦД) з розкриттям деяких механізмів системних метаболічних перетворень, розширилися та дещо змінилися терапевтичні підходи до лікування захворювання. Проте залишився актуальним пошук ефективних антидіабетичних засобів, які б мали цілеспрямовану дію, безпосередньо впливаючи на центральні механізми розвитку ЦД, і тим самим запобігали або сповільнювали темпи розвитку діабетичних ускладнень.

Однією з основних патогенетичних ланок ЦД, як наслідок хронічної гіперглікемії, є інтенсифікація процесів вільнорадикального окиснення і розвиток оксидативного стресу. Продукція вільних радикалів відбувається з перетворенням глюкози в енольну форму, активуванням обміну її сорбітоловим шляхом, а також шляхом неферментативного глікозилювання білків. Відомо, що розвиток оксидативного стресу безпосередньо пов'язаний зі станом оксидоазотної системи. Оксид азоту (NO), будучи потужним поліфункціональним біологічним посередником, координує взаємодію деяких ензимів системи антиоксидантного захисту (АОЗ), модулює міжнейронні комунікації, регулюючи метаболічні процеси, зокрема вільнорадикальні перетворення, здійснює

внутрішньоклітинну передачу сигналу та вивільнення нейротрансмітерів [1]. Стан оксидативного стресу виникає як через посилене утворення вільнорадикальних продуктів, так і внаслідок пригнічення механізмів АОЗ. Тому під час фармакотерапії ЦД виправданим є використання таких лікарських засобів, які б мали не тільки виражені антигіперглікемічні властивості, але й були здатними коригувати інтенсивність і виразність вільнорадикальних реакцій, тобто проявляли антиоксидантну активність.

Одним із подібних антидіабетичних засобів є похідне сукцинатів – β -фенілетиламід 2-оксисукцинанілової кислоти під назвою фенсукцинал. Цей оригінальний лікарський засіб має виразну антигіперглікемічну і антиоксидантну активність, здатний стимулювати регенерацію й секреторну функцію β -клітин підшлункової залози та захищати їх від деструкції діабетогенними чинниками, знижувати інсулінорезистентність різного генезу [2].

Активність більшості лікарських засобів залежить від особливостей їх метаболізму, тому для більш повного розуміння шляхів реалізації їх специфічної активності і виявлення можливих небажаних ефектів вагоме значення мають дослідження проявів і механізмів дії встановлених або потенційних метаболітів

© О.С. Лалименко, І.А. Палагіна, М.Я. Кудря, Н.В. Мельниківська, 2013

лікв, які можуть вплинути на фармако- та токсикокінетичні (або динамічні) властивості вихідної сполуки. Згідно з теорією метаболізму одним із передбачуваних метаболітів I фази біотрансформації антидіабетичного засобу – фенсукциналу є β -фенілетилсукцинамід (β -ФЕСА). У зв'язку з цим для визначення вкладу зазначеного метаболіту в специфічні та можливі побічні ефекти фенсукциналу доречним є дослідження його біологічної дії в умовах ізольованого надходження до організму.

Метою дослідження було визначити вплив β -ФЕСА – метаболіту антидіабетичного засобу із групи похідних сукцинатів на стан обміну оксиду азоту, процесів вільнорадикального окиснення та антиоксидантного захисту, оцінити його можливий вклад у реалізацію антиокислювальної дії лікарського засобу.

Матеріал і методи. Експерименти проведено на 32 статевозрілих нелінійних білих щурах-самцях відповідно до загальних принципів біоетики. Біологічну активність β -ФЕСА досліджували в умовах субхронічного (30-денного) внутрішньошлункового введення зависі сполуки, яку готували на Твін-80. Сполуку вводили в дозі 18 мг/кг маси тіла, яку розраховували як еквімолярну ефективній дозі фенсукциналу (25 мг/кг). Контрольні тварини отримували еквівалентний об'єм Твін-80. По закінченні експерименту тварин знеживлювали декапітацією під легким ефірним наркозом. Біосубстрат (плазму крові, сечу та гомогенат печінки) використовували у подальших біохімічних дослідженнях.

Інтенсивність метаболізму оксиду азоту оцінювали за рівнем нітритів (NO_2^-) і нітратів (NO_3^-) у плазмі крові, сечі та тканині печінки спектрофотометричним методом з використанням реактиву Грися [3]. Активність синтази оксиду азоту (КФ 1.14.13.19) визначали в гомогенаті печінки кінетичним методом за швидкістю окиснення НАДФН+Н⁺ у реакційній суміші: 0,1 М трис-НСІ буфер (рН = 7,4), який містив 10 мМ CaCl_2 , 40 мМ водний розчин аргініну, 1 мМ водний розчин НАДФН+Н⁺, реакцію запускали додаванням 0,1 мл гомогенату печінки. Гомогенат готували на бідистильованій воді у розведенні 1 : 10. Загальний об'єм проби складав 3 мл. У контрольні проби замість розчину НАДФН+Н⁺ додавали бідистильовану воду. Реєстрували зниження екстинції дослідних проб, які вимірювали проти контрольних, при 340 нм

протягом 5-хвилинної інкубації при 37 °С. Активність NOS виражали у нмоль НАДФН+Н⁺/хв·1 мг білка [4].

Стан системи АОЗ оцінювали за наступними показниками: загальна антиокислювальна активність [5], вміст відновленого глутатіону в сироватці крові [6], активність каталази (КФ 1.11.1.6) у сироватці та гомогенаті печінки [7], супероксиддисмутази (СОД) (КФ 1.15.1.1) у гомогенаті печінки [8], активність глутатіонзалежних ферментів: глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9), глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2) у гемолізаті еритроцитів і гомогенаті печінки [9], глутатіонтрансферази (КФ 2.5.1.18) у гомогенаті печінки [10]. Досліджували спонтанну та метал-каталітичну окисну модифікацію білків у сироватці крові та гомогенаті печінки. Визначали рівень карбонілованих білків, які утворюються в реакції з 2,4-динітрофенілгідрозином (2,4-ДНФГ), а саме аліфатичних альдегід- і кетон-динітрофенілгідрозинів нейтрального та основного характеру з характерним спектром поглинання [11]. Для розрахунку активності ферментів визначали концентрацію загального гемоглобіну крові та вміст білка в гомогенаті печінки за методом М. Бредфорда.

Отримані дані статистично обробили із використанням t-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Аналіз показників стану оксидоазотної системи показав, що за умов субхронічного внутрішньошлункового введення β -ФЕСА в дозі 18 мг/кг маси тіла знижувалась на 20 % сумарна активність NO-синтази (NOS) у тканині печінки піддослідних щурів порівняно з контрольною групою тварин. Це зниження, ймовірно, відбувалось завдяки конститутивній формі ферменту та позначалось на падінні концентрації стабільних кінцевих метаболітів NO в плазмі крові щурів. Так, під впливом β -ФЕСА вміст NO_2^- було зменшено практично на 30 %, а рівень NO_3^- – на 9,4 %, що втричі було більш сповільненим порівняно з нітрит-аніоном, тобто відбувалося диспропорційне зниження рівнів досліджених метаболітів NO (таблиця).

Відомо, що саме вміст NO_2^- в плазмі крові найбільшою мірою віддзеркалює ступінь активності ендотеліальної NOS і є пропорційним загальному ендотеліальному синтезу NO порівняно з іншими метаболітами біоактивного NO, які теж за певних умов можуть виділяти його у вільному вигляді, тобто служити його депо [12].

Показники стану обміну оксиду азоту, оксидної модифікації білків (ОМБ)
та системи антиоксидантного захисту у щурів
за умов субхронічного впливу β -ФЕСА (\bar{X} $S\bar{x}$)

Показник	n	Контроль	n	β -ФЕСА
NO₂⁻:				
плазма крові, мкмоль/л;	7	5,85±0,70	8	4,25±0,45*
сеча, мкмоль/л;	7	8,43±0,28	7	7,85±0,18*
печінка, нмоль/мг білка	9	43,60±1,40	12	42,90±1,90
NO₃⁻:				
плазма крові, мкмоль/л;	7	25,40±0,70	8	23,90±0,40*
сеча, мкмоль/л;	7	64,00±1,60	7	60,70±0,90*
печінка, нмоль/мг білка	10	61,10±2,50	12	59,60±2,30
Активність NOS (V_{max}), нмоль NADPH/(мг білка·хв)	7	1,97±0,14	5	1,58±0,14*
Глутатіон відновлений, мг/100 мл	10	22,10±2,80	7	31,40±2,80*
Глутатіонпероксидаза:				
еритроцитів, мкмоль/ (г Нб·хв);	7	172,90±16,40	6	208,10±4,50 [#]
печінки, нмоль/(мг білка·хв)	10	125,20±13,40	8	101,80±6,80
Спонтанна ОМБ:				
сироватка крові:				
КБ ₃₅₆ , о.о.г./г білка	7	32,00±3,10	7	23,40±4,00 [#]
КБ ₃₆₃ , о.о.г./г білка	7	33,90±3,10	7	24,50±4,20 [#]
ммоль/г білка	7	1,62±0,15	7	1,17±0,20 [#]
КБ ₃₇₀ , о.о.г./г білка	7	34,50±3,20	7	24,70±4,20 [#]
ммоль/г білка	7	1,64±0,15	7	1,17±0,20 [#]
гомогенат печінки:				
КБ ₃₅₆ , о.о.г./г білка	8	106,30±10,00	7	64,20±11,90*
КБ ₃₆₃ , о.о.г./г білка	8	104,80±8,80	7	66,50±12,40*
ммоль/г білка	8	4,99±0,42	7	3,17±0,59*
КБ ₃₇₀ , о.о.г./г білка	8	93,90±5,70	7	66,20±13,10*
ммоль/г білка	8	4,47±0,27	7	3,16±0,63 [#]
Fe²⁺-H₂O₂-індукована ОМБ:				
сироватка крові:				
КБ ₅₃₀ , о.о.г./г білка	9	2,02±0,33	6	3,30±0,66 [#]
гомогенат печінки:				
КБ ₃₅₆ , о.о.г./г білка	8	248,00±31,90	7	155,00±1,40*
КБ ₃₆₃ , о.о.г./г білка	8	248,70±28,90	7	153,50±21,80*
ммоль/г білка	8	11,80±1,40	7	7,31±1,04*
КБ ₃₇₀ , о.о.г./г білка	8	245,50±28,40	7	152,70±20,80*
ммоль/г білка	8	11,70±1,40	7	7,27±0,99*
КБ ₄₃₀ , о.о.г./г білка	8	108,30±14,30	5	42,80±7,00*

Примітки: 1. о.о.г. – одиниці оптичної густини.

2.* p < 0,05; # 0,05 < p < 0,1.

У той час як близько 90 % NO₂⁻, що циркулює в плазмі, є результатом NOS-активності, а його рівень загалом відображає зміни локальної активності ферменту, то вміст внутрішньо-судинного NO₃⁻ лише частково залежить від активності NOS-залежних шляхів його метаболізму [13, 14]. Це деякою мірою може пояснити помітне падіння рівня NO₂⁻, але слід врахувати, що молекула NO₂⁻ є більш реакційно-

спроможною, ніж NO₃⁻, і завдяки цьому залучена в широке коло метаболічних перетворень, що також може позначатися на її вмісті.

Важливу роль у виведенні із організму ендогенних (або екзогенних) неорганічних продуктів обміну азоту відіграють нирки, забезпечуючи фізіологічні механізми підтримки їх концентрацій у позаклітинній рідині організму [15, 16].

Отже, на рівень NO_2^- і NO_3^- у позаклітинній рідині може впливати як інтенсивність продукції NO, що забезпечується взаємодією NO-синтазної та нітрит-редуктазної ланки циклу NO, так і темпи ниркового кліренсу [17].

В наших дослідженнях у сечі щурів виявлено зменшення концентрації як нітрит-, так і нітрат-аніонів. Напрямок змін зазначених показників у сечі співпадав з тим, що спостерігали в плазмі крові щурів, але за ступенем ці зміни були менш вираженими. Зокрема, рівень NO_2^- знижувався на 7 %, а NO_3^- – на 5,2 % відносно значень в контролі (таблиця). Відзначений ступінь падіння концентрацій NO_2^- і NO_3^- у сечі, ймовірно, може бути пов'язаний не тільки із пригніченням NO-синтазного механізму регуляції концентрації NO, а із посиленням їх каналцевої реабсорбції у проксимальному сегменті нефрону, що деякою мірою може протидіяти втраті організмом біологічно важливого NO у вигляді NO_2^- і NO_3^- .

У тканині печінки піддослідних щурів концентрації NO_2^- і NO_3^- статистично не відрізнялись від значень показників у контрольних тварин, незважаючи на пригнічення активності NOS (таблиця). Збереження тканинного пулу зазначених метаболітів NO, ймовірно, обумовлено високими резервно-адаптаційними можливостями печінки, завдяки яким може відбуватися активація послідовних реакцій відновлення зазначених метаболітів у замкненому циклі перетворень NO [18].

Дослідженнями стану вільнорадикального окиснення встановлено, що в умовах субхронічного введення β -ФЕСА в дозі 18 мг/кг ступінь спонтанного ОМБ у сироватці крові та гомогенаті печінки піддослідних щурів був нижчим, ніж у контрольних тварин. Даний ефект проявлявся у вигляді зниження рівня KB_{356} , KB_{363} та KB_{370} , зареєстрований для альдегід- і кетон-динітрофенілгідрозонів нейтрального характеру (АДНФГн, КДНФГн). Падіння рівня КДНФГн може свідчити про деяке пригнічення процесів агрегації білкових молекул, а аналогічного напрямку зміни рівнів АДНФГн – про гальмування утворення низькомолекулярних продуктів деградації білків.

При вивченні метал-каталітичного окиснення протеїнів у сироватці крові під впливом β -ФЕСА зафіксовано підвищення вмісту KB_{530} , тобто кетон-динітрофенілгідрозонів основного характеру (КДНФГо). Зміни цього показника,

який є пізнім маркером окислювальної деструкції білків, можуть свідчити про зростання кількості відповідного білкового субстрату для окиснення в умовах індукції іонами Fe^{2+} та можливості його залучання у ці процеси. У тканині печінки піддослідних щурів зафіксовано вірогідне зменшення показників МКО: KB_{356} , KB_{363} , KB_{370} , KB_{430} , тобто АДНФГн, КДНФГн та КДНФГо (таблиця), що свідчить про більш низьку інтенсивність процесів Fe^{2+} -індукованої окисної маси білків у порівнянні з контролем.

При дослідженні показників активності глутатионової ланки АОЗ під впливом β -ФЕСА відзначено вірогідне підвищення на 42 % у сироватці крові вмісту відновленого глутатіону, який є ключовим антиоксидантом і редокс-буфером клітин. З боку глутатіонзалежних ферментів та інших ферментів АОЗ зареєстровано лише підвищення активності глутатіонпероксидази у гемолізаті еритроцитів щурів на 20 % порівняно з контролем ($0,05 < p < 0,1$). Підвищення рівнів глутатінопероксидази та відновленого глутатіону, ймовірно, можна розглядати як прояви антиоксидантної дії β -ФЕСА. Останнє підтверджується виявленим за даних умов експозиції зниженням рівня продуктів спонтанного та Fe^{2+} -індукованого пероксидного окиснення білків і уповільненням обміну NO.

Висновки

1. β -фенілетилсукцинамід в умовах субхронічного введення в дозі 18 мг/кг маси тіла викликає зниження активності NO-синтази і, як наслідок, падіння концентрацій NO_2^- і NO_3^- у плазмі і сечі щурів, що вказує на уповільнення синтезу NO та позначається на стані вільнорадикального окиснення.

2. Введення β -фенілетилсукцинамиду призводить до зниження ступеня спонтанної і Fe^{2+} -індукованої окислювальної модифікації білків та збільшення потужності глутатионової ланки антиоксидантного захисту, що може сприяти підвищенню стійкості організму до окислювального стресу.

3. β -фенілетилсукцинамід – метаболіт I фази біотрансформації фенсукцинала може впливати на прояви антиокислювальної дії лікарського засобу завдяки здатності уповільнювати процеси вільнорадикального окиснення, метаболізму оксиду азоту та стимулюючої дії на активність глутатионової ланки антиоксидантного захисту.

Список літератури

1. *Зенков Н.К.* NO-синтазы в норме и при патологии различного генеза / Н.К. Зенков, Е.Б. Меньщикова, В.П. Реутов // *Вестн. РАМН.* – 2000. – № 4. – С. 30–34.
2. *Горбенко Н.І.* Патогенетичне обґрунтування ефективності похідного янтарної кислоти – фенсукцинала в терапії цукрового діабету та його судинних ускладнень (експериментальне дослідження) : автореф. дис. ... докт. біол. наук : 14.01.14 / Н.І. Горбенко; Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України. – Харків, 2004. – 36 с.
3. Фотометрический метод определения нитратов и нитритов в биологических жидкостях (инструкция по применению) : утв. МЗО Республики Беларусь. – Витебск, 2001. – 9 с.
4. *Сумбаев В.В.* Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс / В.В. Сумбаев, И.М. Ясинская // *Совр. пробл. токсикологии.* – 2000. – № 3. – С. 3 – 7.
5. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: метод. рекомендации / РАМН [авт. А.В. Арутюнян и др.]. – СПб., 2000. – С. 76.
6. *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.
7. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // *Лаб. дело.* – 1988. – № 1 – С. 16–19.
8. *Костюк В.А.* Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // *Вопросы мед. химии.* – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88–91.
9. Біохімічні та біофізичні методи оцінки порушень окислювального гомеостазу в осіб, що зазнали радіаційного впливу внаслідок аварії на ЧАЕС : метод. рекомендації / МОЗ України, Акад. мед. наук України ; уклад. Л.М. Овсяннікова та ін. – К., 1999. – С. 7–9.
10. Методы оценки свободнорадикального окисления и тиоксидантной системы организма : метод. рекомендации / РАМН; сост. А.В. Арутюнян и др. – СПб., 2000. – С. 76.
11. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов [и др.] // *Вопросы. мед. химии.* – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24–26.
12. Emerging role of nitrite in human biology / A. Dejam, C.J. Hunter, A.N. Schechter, M.T. Gladwin // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2004. – Vol. 32, № 3. – P. 423–429.
13. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action / T. Lauer, M. Preik, T. Rassaf [et al.] // *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA.* – 2001. – Vol. 98. – P. 12814–12819.
14. *Lundberg J.O.* The biological role of nitrate and nitrite: the times they are a-changin / J.O. Lundberg, E. Weitzberg // *Nitric Oxide.* – 2010. – Vol. 22, № 2. – P. 61–63.
15. *Jungersten L.* Plasma nitrate as an index of nitric oxide formation in man: analyses of kinetics and confounding factors / L. Jungersten, A. Edlund, A.S. Petersson [et al.] // *Clin. Physiol.* – 1996. – Vol. 16, № 4. – P. 369–379.
16. *Гоженко А.І.* Роль оксиду азоту в молекулярно-клітинних механізмах функції нирок / А.І. Гоженко // *Укр. біохім. журн.* – 2002. – Т. 74, № 4а. – С. 96.
17. Relation between pressure natriuresis and urinary excretion of nitrate/ nitrite in anesthetized dogs / D.S. Majid, M. Godfrey, M.B. Grisham [et al.] // *Hypertension.* – 1995. – Vol. 25, № 4. – P. 860–865.
18. *Реутов В.П.* Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, В.Е. Охотин [и др.] // М.: Наука.– 1998. – 156 с.

О.С. Лалыменко, И.А. Палагина, М.Я. Кудря, Н.В. Мельниковская

ВЛИЯНИЕ β-ФЕНИЛЭТИЛСУКЦИНАМИДА НА МЕТАБОЛИЗМ ОКСИДА АЗОТА И СОСТОЯНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ У КРЫС

Исследовано субхроническое воздействие β-фенилэтилсукцинамида, метаболита антидиабетического средства – производного янтарной кислоты, на обмен оксида азота, состояние свободнорадикальных процессов и антиоксидантной защиты у крыс. Установлено, что данное

соединение вызывает снижение активности NO-синтазы, уровня конечных метаболитов NO и степени окислительной модификации белков, но одновременно повышает активность глутатионовой системы. С образованием в организме этого метаболита может быть связано антиокислительное действие самого лекарственного средства при его целевом использовании.

Ключевые слова: *β-фенилэтилсукцинамид, оксид азота, свободнорадикальные процессы, антиоксидантная защита.*

O.S. Lalimenko, I.A. Palagina, M.Ya. Kudria, N.V. Melnykivska

β-PHENYLETHYLSUCCINAMIDE IMPACT ON NITRIC OXIDE METABOLISM AND STATE OF FREE-RADICAL PROCESSES IN RATS

Paper studies a subchronic impact of β-phenylethylsuccinamide (an anti-diabetic drug metabolite – succinic acid derivative) on metabolism of nitric oxide, state of free-radical processes and state of antioxidant protection in rats. We found that the compound caused a decrease in NO-synthase activity, in level of the final NO metabolites and in extent of protein oxidative modification. On the other hand its influence proved to increase the glutathione system activeness. We concluded that the anti-oxidative action of the initial drug when pharmacologically used may be connected with the formation of this metabolite in the organism.

Key words: *β-phenylethylsuccinamide, nitric oxide, free-radical processes, antioxidant protection.*

Поступила 27.05.13