

ВПЛИВ МЕТАБОЛІТІВ АНТИДІАБЕТИЧНОГО ЗАСОБУ НА СТАН ПРОЦЕСІВ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ, СИСТЕМ ОБМІНУ ОКСИДУ АЗОТУ ТА АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ*

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

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків
lab-tox@ukr.net

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

АДЗ — антидіабетичний засіб	КП — карбонільований протеїн
А-ДНФГ — альдегід-динітрофенілгідрозон	МДА — малоновий діальдегід
АОЗ — антиоксидантний захист	ОдА — одиниця абсорбції
АФК — активні форми кисню	ОМП — окислювальна модифікація протеїнів
ВРО — вільнорадикальне окиснення	ОС — окислювальний стрес
β -ФЕА-ОСАК — β -фенілетиламід 2-оксисукциніланілової кислоти	ПОЛ — перекисне окиснення ліпідів
β -ФЕСА — β -фенілетилсукциніламід	СОД — супероксиддисмутаза
ГП — глутатіонпероксидаза	ЦД — цукровий діабет
ГПЛ — гідропероксид ліпідів	2,4-ДНФГ — 2,4-динітрофенілгідрозон
ГР — глутатіонредуктаза	2-ГФСА — 2-гідроксифенілсукциніламід
ГТ — глутатіонтрансфераза	GSH — відновлений глутатіон
ДК — дієтові кон'югати	NO — оксид азоту
КАТ — каталаза	NO• — нітроксид азоту
К-ДНФГ — кетон-динітрофенілгідрозон	NO ₂ — нітрит
	NO ₃ — нітрат
	NOS — синтаза нітроксид азоту
	ONOO ⁻ — пероксинітрит

На сучасному етапі вивчення патогенезу цукрового діабету (ЦД) суттєво розширені уявлення щодо факторів ризику та механізмів розвитку захворювання, доповнені діагностичні показники, розроблені ефективні способи профілактики та корекції да-

ної патології. Продовжується активний пошук антидіабетичних засобів (АДЗ), які б проявляли не тільки антигіперглікемічний ефект, але й антиоксидантний, енергостимулюючий, імуномодулюючий, підвищували функціональну активність панкреатич-

* Дослідження виконано в лабораторії токсикології та гігієнічного регламентування лікарських засобів ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України» у межах НДУ «Визначити біологічну активність та безпечність продуктів біотрансформації антидіабетичного засобу фенсукциніалу» (державний реєстраційний номер № 0111U000176).

Установою, що фінансує роботу, є НАМН України.

Автори гарантують колективну відповідальність за все, що опубліковано у статті.

Автори гарантують відсутність конфлікту інтересів та власної фінансової зацікавленості при виконанні роботи та написанні статті.

Рукопис надійшов до редакції 21.03.2015.

них β -клітин та водночас були практично нетоксичними. В цьому аспекті на особливу увагу заслуговують похідні янтарної кислоти — аналоги одного із основних метаболітів циклу трикарбонових кислот, які є донорами енергетичного субстрату та здатні корегувати вільнорадикальне окиснення.

Оригінальним АДЗ зазначеної групи є β -фенілетиламід 2-оксисукцинілової кислоти (β -ФЕА-ОСАК), який синтезовано в ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України». Він стимулює регенерацію та секреторну функцію β -клітин підшлункової залози, захищає їх від деструкції діабетогенними чинниками, знижує інсулінорезистентність та прояви супутніх метаболічних порушень, гальмує розвиток діабетичних мікро- і макроангіопатій. Механізми його антидіабетичної дії пов'язані з поліпшенням біоенергетичних процесів, пригніченням окислювального стресу (ОС) у мітохондріях і зниженням неферментативного глікозилювання [1].

Більшість лікарських засобів в організмі підлягає біотрансформації, що може впливати на прояви різних видів їх активності. Утворення активних метаболітів ліків суттєво позначається на метаболічному статусі, тому визначення критеріїв їх впливу, які є дозозалежними, має важливе значення для прогнозування як специфічних ефектів, так і можливих несприятливих змін в організмі. Встановлено, що продуктами першої фази біотрансформації β -ФЕА-ОСАК є 2-гідроксифенілсукцинамід (2-ГФСА) і β -фенілетилсукцинамід (β -ФЕСА), які за хімічною будовою також є похідними янтарної кислоти і можуть вносити певний вклад у фармакологічну активність вихідної сполуки.

На етапі впровадження нового АДЗ у медичну практику особливо актуальним є питання щодо безпечності його застосування, що значною мірою може залежати від наявності токсичного потенціалу у його метаболітів. У зв'язку з цим доцільною є оцінка можливих побічних ефектів метаболітів АДЗ для організму, що передбачає дослідження найбільш чутливих до їх впливу ла-

нок метаболічного гомеостазу, які займають ключові позиції у механізмах токсичної дії сполук. Одним із універсальних механізмів інтоксикації є збільшення продукції вільних радикалів та активація пероксидного окиснення ліпідів з порушенням структури клітинних мембран та пригнічення активності локалізованих в них ферментних систем. За вільнорадикальним механізмом відбувається і окислювальна модифікація протеїнів (ОМП), підсилення якої є одним із ранніх та найбільш надійних маркерів ОС [2]. Зазначені зміни пов'язані зі станом системи антиоксидантного захисту (АОЗ), активація якої в умовах ОС протидіє надлишковому утворенню прооксидантів. У регуляції вільнорадикальних процесів і механізмів антиоксидантного захисту важливу роль відіграє оксидазотна система. Активні форми азоту ($\text{NO}\bullet$ — нітроксид азоту, ONOO^- — пероксинітрит) викликають окислювальну модифікацію біополімерів, що призводить до порушення тканинного дихання у внутрішній мембрані мітохондрій та процесів гідроксилування у мікосомах. Відомо, що зміни метаболізму оксиду азоту (NO) позначаються на вазодилатації, нейротрансмісії, зниженні агрегації та адгезії тромбоцитів, інгібуванні десквамації ендотелію. NO координує взаємодію ензимів АОЗ, а також є високо реактивним месенджером, який вільно проникає крізь біологічні мембрани та легко вступає у реакції з іншими сполуками, регулює вільнорадикальні та інші метаболічні перетворення [3].

Натепер остаточно не з'ясовано характер дії сукцинатвмісних сполук на стан вільнорадикальних процесів та систему АОЗ в залежності від доз та тривалості експозиції.

Мета роботи — дослідження впливу метаболітів антидіабетичного засобу: 2-гідроксифенілсукцинамиду і β -фенілетилсукцинамиду, на стан процесів пероксидного окиснення протеїнів та ліпідів, обмін оксиду азоту та систему антиоксидантного захисту в організмі щурів за умов субхронічного введення даних сполук у субтоксичних дозах.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експерименти проведено на 64 статевозрілих нелінійних білих щурах-самцях (190–210 г) відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001). Піддослідним щурам вводили 2-ГФСА та β -ФЕСА перорально 30-разово у вигляді водної емульсії з Твін-80 у субтоксичних дозах 68 мг/кг маси тіла і 72 мг/кг маси тіла, відповідно. Дози даних сполук були еквімолярними субтоксичній дозі β -ФЕА-ОСАК, яка складає 100 мг/кг маси тіла. Контрольні тварини отримували еквівалентний об'єм водної емульсії Твін-80. Після завершення експериментів тварин знеживлювали декапітацією під легким ефірним наркозом. Кожна піддослідна та відповідна контрольна група нараховувала 8 тварин. В біохімічних дослідженнях використовували біосубстрати: плазму, сироватку крові, цільну кров, сечу, гемолізат еритроцитів, гомогенат печінки.

Активність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за вмістом дієнових кон'югатів (ДК) [4], гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) [5] та малонового діальдегіду (МДА) [6] у сироватці або цільній крові та 10 % гомогенаті печінки. Оцінювали ступінь спонтанного та металкаталізуемого окиснення протеїнів у сироватці крові та 5 % гомогенаті печінки. Визначали вміст фракцій карбонільованих протеїнів: КП₃₅₆, КП₃₇₀, КП₄₃₀, КП₅₃₀, які є продуктами взаємодії окислювальних амінокислотних залишків протеїнів з 2,4-динітрофенілгідрозином (2,4-ДНФГ), а саме: аліфатичними альдегід- та кетон-динітрофенілгідрозонами (А-ДНФГ, К-ДНФГ) нейтрального та основного характеру. Вміст КП виражали в одиницях абсорбції (ОдА) на грам протеїну [7].

Стан системи антиоксидантного захисту досліджували за вмістом відновленого глутатіону (GSH) у крові [8] та активністю глутатіонзалежних ферментів: глутатіонредуктази (ГР) (КФ 1.6.4.2) у гемолізаті

еритроцитів [7], глутатіонпероксидази (ГП) (КФ 1.11.1.9) у гемолізаті еритроцитів та 10 % гомогенаті печінки, глутатіонтрансферази (ГТ) (КФ 2.5.1.18) у 10 % гомогенаті печінки [9]. Визначали активність каталази (КАТ) (КФ 1.11.1.6) у сироватці крові та 10 % гомогенаті печінки [10], і супероксиддисмутази (СОД) (КФ 1.15.1.1) у 10 % гомогенаті печінки [7].

Інтенсивність метаболізму NO оцінювали за рівнем нітритів (NO_2^-) та нітратів (NO_3^-) в плазмі крові, сечі та 5 % гомогенаті печінки спектрофотометричним методом за допомогою реакції Гріса [11]. Активність NO-синтази (NOS) (КФ 1.14.13.19) визначали у 10 % гомогенаті печінки за швидкістю окиснення $\text{NADPH}+\text{H}^+$ у реакційній суміші: 2,5 мл 0,1 М трис-НСІ буферу (рН=7,4), який містив 10 мМ CaCl_2 , 0,3 мл 40 мМ водного розчину аргініну, 0,1 мл 1 мМ водного розчину $\text{NADPH}+\text{H}^+$, до якої додавали 0,1 мл гомогенату печінки [12]. Реєстрували зниження абсорбції дослідних проб, які вимірювали проти контрольних, на спектрофотометрі Shimadzu UV-1800 (Японія) при $\lambda=340$ нм протягом 5 хв при 37°C. Активність NOS виражали у нмоль $\text{NADPH}+\text{H}^+$ /хв·мг протеїну. Для розрахунку активності ензимів та рівня продуктів окиснення визначали вміст білка у гомогенаті печінки методом М. Бредфорда [13].

Нормальність розподілу в рядах визначали з використанням критерію Шапіро-Уїлка (W). Парне порівняння груп досліду з інтактним контролем проводили з використанням критерію Ст'юдента. Множинне порівняння виконували за допомогою тесту Т'юкі. Результати представлені у вигляді середнього арифметичного та його статистичної похибки ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$). Вірогідними вважали дані при $p < 0,05$ та близькими до статистично значущих при $0,05 < p < 0,1$. Кореляційний аналіз проведено методом Пірсона.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідженнями стану окислювального гомеостазу встановлено, що в умовах ізольованого субхронічного введення метаболітів β -ФЕСА-ОСАК у субтоксичних дозах відмічаються ознаки активації ПОЛ в організмі щурів. За впливу β -ФЕСА зареєстровано виражене зростання вмісту первинних та вторинних метаболітів ПОЛ: ГПЛ на 42% у сироватці крові, МДА на 42% у крові та

меншою мірою у тканині печінки. За умов введення 2-ГФСА у сироватці крові підвищується на 41% рівень ДК, які належать до первинних продуктів ПОЛ (табл. 1).

Поряд з інтенсифікацією ПОЛ дані сполуки впливають на стан окисної модифікації протеїнів. Дослідження цього процесу становить особливий інтерес, враховуючи, що саме протеїни є основною мішенню

Т а б л и ц я 1

Показники стану перекисного окиснення ліпідів та окислювальної модифікації протеїнів у щурів за впливу β -ФЕСА і 2-ГФСА

Показник, одиниці виміру	Група тварин			
	Контроль 1	β -ФЕСА	Контроль 2	2-ГФСА
1	2	3	4	5
ДК: сироватка, мкмоль/л % до контролю	2,48 ± 0,14	2,35 ± 0,16 (94,7 ± 6,5)	3,64 ± 0,13	5,12 ± 0,46* (140,6 ± 12,7) [#]
печінка, нмоль/мг протеїну % до контролю	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,01 (92,9 ± 7,8)	0,18 ± 0,02	0,19 ± 0,03 (106,3 ± 14,1)
ГПЛ: сироватка, мкмоль/л % до контролю	3,08 ± 0,17	4,37 ± 0,35* (141,8 ± 11,4) ^{##}	5,02 ± 0,59	5,92 ± 0,44 (117,9 ± 8,8)
печінка, нмоль/мг протеїну % до контролю	0,53 ± 0,05	0,48 ± 0,05 (90,1 ± 9,3)	0,38 ± 0,06	0,55 ± 0,10 (145,5 ± 26,4) ^{##}
МДА: кров, мкмоль /л % до контролю	0,92 ± 0,11	1,28 ± 0,06* (141,9 ± 7,1) [#]	1,07 ± 0,06	1,16 ± 0,05 (109,0 ± 4,2)
печінка, нмоль/мг протеїну % до контролю	0,43 ± 0,03	0,52 ± 0,03** (120,1 ± 5,8)	0,26 ± 0,03	0,39 ± 0,07 (149,9 ± 26,9)
Спонтанна ОМП сироватки, Од.А/г протеїну: КП ₃₅₆ % до контролю	23,1 ± 3,1	21,0 ± 2,2 (90,8 ± 9,4)	29,0 ± 1,8	28,6 ± 1,4 (98,7 ± 4,9)
КП ₃₇₀ % до контролю	23,0 ± 1,9	22,2 ± 2,1 (96,4 ± 9,0)	25,8 ± 1,0	30,6 ± 2,1** (118,7 ± 8,1) ^{##}
КП ₄₃₀ % до контролю	13,8 ± 2,0	12,0 ± 1,2 (86,9 ± 8,4)	11,7 ± 0,8	14,6 ± 1,1** (124,7 ± 9,0) [#]
КП ₅₃₀ % до контролю	2,20 ± 0,24	1,62 ± 0,24 (73,4 ± 11,1)	1,74 ± 0,15	1,79 ± 0,31 (103,0 ± 17,7)
Fe ²⁺ -індукована ОМП сироватки, Од.А/г протеїну: КП ₃₅₆ % до контролю	66,2 ± 2,9	60,0 ± 2,2 (90,6 ± 3,3)	49,6 ± 3,9	49,4 ± 1,1 (99,5 ± 2,2) ^{##}
КП ₃₇₀ % до контролю	73,6 ± 3,0	70,0 ± 3,6 (95,2 ± 4,9)	51,3 ± 3,5	52,7 ± 0,8 (102,8 ± 1,6)
КП ₄₃₀ % до контролю	44,1 ± 1,9	44,5 ± 2,2 (102,6 ± 5,8)	28,5 ± 1,8	32,5 ± 1,2** (114,1 ± 4,1)
КП ₅₃₀ % до контролю	6,69 ± 0,92	4,65 ± 0,49** (69,5 ± 7,3)	3,05 ± 0,36	4,64 ± 0,21* (152,2 ± 6,7) [#]

Закінчення на наст. стор.

Т а б л и ц я 1 Закінчення. Поч. на попер. стор.

1	2	3	4	5
Спонтанна ОМП печінки, Од. А/г протеїну: КП ₃₅₆ % до контролю	114,6 ± 4,9	145,4 ± 13,5** (126,9 ± 11,7) #	102,0 ± 10,7	81,3 ± 9,0 (79,8 ± 8,8)
КП ₃₇₀ % до контролю	108,5 ± 4,9	135,2 ± 11,6** (124,6 ± 10,7) #	100,1 ± 10,5	80,7 ± 8,6 (80,6 ± 8,6)
КП ₄₃₀ % до контролю	42,7 ± 3,0	66,3 ± 2,8* (155,2 ± 6,6) #	47,9 ± 4,4	28,8 ± 3,1* (60,1 ± 6,4)
КП ₅₃₀ % до контролю	8,31 ± 0,72	13,6 ± 2,1* (163,7 ± 24,9) #	9,1 ± 0,5	5,2 ± 0,7* (57,0 ± 8,0)
Fe ²⁺ -індукована ОМП печінки, Од. А/г протеїну: КП ₃₅₆ % до контролю	251,6 ± 18,7	242,0 ± 18,5 (96,2 ± 7,3)	180,0 ± 22,4	228,0 ± 39,0 (126,7 ± 21,7)
КП ₃₇₀ % до контролю	252,0 ± 17,9	247,2 ± 17,5 (98,1 ± 6,9)	192,6 ± 27,4	234,3 ± 39,2 (121,6 ± 20,4)
КП ₄₃₀ % до контролю	162,6 ± 10,7	169,8 ± 11,1 (104,4 ± 6,8)	146,5 ± 23,3	162,2 ± 26,2 (110,7 ± 17,9)
КП ₅₃₀ % до контролю	24,4 ± 2,6	23,8 ± 3,9 (97,6 ± 16,0)	25,8 ± 4,2	36,7 ± 6,5 (142,1 ± 25,0)

П р и м і т к а. * — відхилення значуще порівняно з контролем, $p \leq 0,05$; ** — відхилення близьке до значущого порівняно з контролем, $0,05 < p \leq 0,1$; # — відхилення значуще при порівнянні груп « β -ФЕСА» і «2-ГФСА», $p \leq 0,05$; ## — відхилення близьке до значущого при порівнянні груп « β -ФЕСА» і «2-ГФСА», $0,05 < p \leq 0,1$; ОМП — окислювальна модифікація протеїнів, ДК — дієнові кон'югати, ГПЛ — гідропероксиди ліпідів, МДА — малоновий діальдегід, КП — карбонільовані протеїни, Од. А — одиниця абсорбції.

атаки з боку вільних радикалів, у першу чергу, активних форм кисню (АФК). Іншими індукторами ОМП можуть бути збільшення рівня вільного заліза і продуктів ПОЛ за умов зниження активності АОЗ. Внаслідок індукції ОМП порушується нативна конформація ряду доменів протеїнів та формуються протеїнові агрегати або відбувається фрагментація протеїнових молекул накопиченням токсичних низькомолекулярних продуктів їх деградації. Модифікації структурної організації протеїнів сприяють посиленню мембранних пошкоджень, інактивації ферментів та є сигналом для змін клітинного метаболізму. Крім того продукти ОМП мають тривалий період розпаду порівняно з продуктами ПОЛ і, відповідно, є більш надійними маркерами інтенсивності вільнорадикального окиснення (ВРО) [2].

За умов введення β -ФЕСА у печінці підвищується активність спонтанної ОМП, що охоплює всі досліджені фракції КП, але найбільш виражене для КП₅₃₀ і КП₄₃₀, тобто тих протеїнів, які модифіковані за залишками амінокислот основного характеру (вище на 64% і 55% від контролю). Відомо, що

рівень саме цих фракцій КП збільшується при ЦД та метаболічному синдромі [14], тому дані показники цілком закономірно можуть бути високочутливими до впливу АДЗ та його метаболітів, що залежить від їх концентрації в організмі. Встановлено, що β -ФЕСА в однаковій мірі стимулює утворення альдегід-ДНФГ (КП₃₅₆ і КП₄₃₀) і кетон-ДНФГ (КП₃₇₀ і КП₅₃₀), перші з яких є маркерами фрагментації, а другі — агрегації протеїнів. При додаванні у середовище інкубації Fe²⁺ не зареєстровано змін ступеня окисної деструкції протеїнів у печінці щурів, які отримували β -ФЕСА, порівняно з контролем. Враховуючи це, а також менш виражену активацію ПОЛ порівняно з ОМП, можна вважати, що утворення КП здійснюється переважно шляхом прямого окиснення в основному (NH₃⁺)-груп залишків амінокислот за безпосередньої атаки АФК. За дії 2-ГФСА спонтанний рівень КП₅₃₀ і КП₄₃₀ у печінці, навпаки, дещо знижується (табл. 1).

Зміни інтенсивності ОМП у сироватці крові віддзеркалюють загальну спрямованість вільнорадикальних процесів у цілісно-

му організмі. За впливу β -ФЕСА у сироватці крові у присутності іонів Fe^{2+} та H_2O_2 спостерігається тенденція до зниження інтенсивності ОМП у вигляді зменшення рівня КП_{530} , що вказує на недостатню кількість резервного субстрату для окиснення. Інший метаболіт β -ФЕА-ОСАК — 2-ГФСА викликає деяке підвищення спонтанного рівня ОМП, а також Fe^{2+} -індукованого, що в основному стосується КП_{530} . Вміст цієї фракції КП збільшується на 52% у сироватці крові, але тільки у присутності іонів Fe^{2+} , які є важливими індукторами ОМП (табл. 1). Внаслідок дії 2-ГФСА у сироватці крові підвищується рівень загального протеїну, що можна розглядати як адаптивну реакцію, спрямовану на поновлення протеїнового складу крові.

Відомо, що інтенсивність ВРО регулюється системою АОЗ, яка приймає участь в утилізації АФК та перекисних сполук. Зміни її активності є одним із найважливіших механізмів забезпечення неспецифічної резистентності клітин до токсичної дії широкого кола ксенобіотиків. У першу лінію ензимів АОЗ входять СОД, яка інактивує висо-

котоксичні кисневі радикали, КАТ і ГП, що функціонально споріднені за здатністю відновлювати перекисні радикали до неактивного стану. Антиоксидантні ензими є адаптивними, і, у свою чергу, їх активність також залежить від концентрації АФК, продуктів ПОЛ та ОМП. Отже, розвиток інтоксикацій значною мірою пов'язаний з порушеннями у системі АОЗ [15].

Встановлено, що застосування β -ФЕСА у субтоксичній дозі призводить до зниження активності ГП у печінці, 2-ГФСА — ГП в еритроцитах крові, але ці зміни супроводжуються компенсаторним підвищенням активності КАТ сироватки крові, а у випадку β -ФЕСА — також і печінки. За введення β -ФЕСА зареєстровано майже двократне підвищення активності ГР в еритроцитах, що позначається на зростанні концентрації GSH у крові, але більш помірному, зважаючи на ймовірні втрати цього найважливішого ресурсу АОЗ, зокрема, у процесах знешкодження метаболітів ВРО (табл. 2).

Стимульоване ізольованим введенням β -ФЕСА зростання рівня різних фракцій КП у печінці на тлі зменшення активно-

Т а б л и ц я 2

Показники антиоксидантного захисту та обміну NO у щурів за впливу β -ФЕСА і 2-ГФСА

Показник, одиниці виміру	Група тварин			
	Контроль 1	β -ФЕСА	Контроль 2	2-ГФСА
1	2	3	4	5
GSH, мг/100 мл % до контролю	27,2 ± 1,9	38,2 ± 5,1** (140,3 ± 18,8)##	14,7 ± 1,9	14,5 ± 1,3 (98,6 ± 9,0)
ГР еритр., мкмоль NADPH/хв-г Нб % до контролю	1,98 ± 0,26	4,05 ± 0,66* (207,1 ± 32,1)#	2,61 ± 0,21	2,56 ± 0,25 (99,8 ± 9,7)
ГП еритр., мкмоль GSSG/хв-г Нб % до контролю	174,7 ± 16,0	169,0 ± 14,0 (96,8 ± 8,0)	196,3 ± 21,8	139,0 ± 9,0* (70,8 ± 4,6)#
ГП печінки, нмоль/хв-мг протеїну % до контролю	102,0 ± 8,8	79,0 ± 7,7** (77,5 ± 7,5)	164,1 ± 27,9	153,6 ± 21,9 (93,6 ± 13,2)
ГТ печінки, нмоль /хв-мг протеїну % до контролю	78,5 ± 8,4	88,8 ± 10,4 (113,0 ± 13,2)	57,8 ± 7,6	71,9 ± 8,0 (124,4 ± 13,9)
Каталаза: сироватки, мкат/л % до контролю	0,96 ± 0,07	1,24 ± 0,08* (128,7 ± 8,1)	1,02 ± 0,09	1,38 ± 0,03* (135,5 ± 3,0)
печінки, нкат/мг протеїну % до контролю	3,41 ± 0,20	4,15 ± 0,22* (121,7 ± 6,5)#	3,79 ± 0,63	3,03 ± 0,35 (79,9 ± 9,2)

Закінчення на наст. стор.

Т а б л и ц я 2 Закінчення. Поч. на поперед. стор.

1	2	3	4	5
СОД печінки, ум. од./хв·мг протеїну % до контролю	427,6 ± 50,2	361,8 ± 36,3 (84,6 ± 8,5)	377,7 ± 81,8	460,9 ± 73,8 (108,6 ± 16,9)
NOS печінки, нмоль/хв·мг протеїну % до контролю	5,15 ± 0,75	3,48 ± 0,43** (67,7 ± 8,3)	3,73 ± 0,34	3,09 ± 0,37 (82,8 ± 9,8)
NO ₂ ⁻ печінки, нмоль/мг протеїну % до контролю	40,7 ± 2,8	33,4 ± 3,2** (82,1 ± 7,8)	35,0 ± 2,6	29,5 ± 2,3 (84,4 ± 6,6)
NO ₃ ⁻ печінки, нмоль/мг протеїну % до контролю	60,1 ± 4,1	50,0 ± 4,6** (83,2 ± 7,7)	51,8 ± 3,7	40,0 ± 6,5 (86,4 ± 6,5)
NO ₂ ⁻ плазми, мкмоль/л % до контролю	4,82 ± 0,26	3,40 ± 0,29* (70,5 ± 5,9)	8,28 ± 0,41	4,07 ± 0,52* (49,2 ± 6,3) [#]
NO ₃ ⁻ плазми, мкмоль/л % до контролю	14,0 ± 0,5	11,4 ± 0,5* (81,3 ± 3,8)	19,5 ± 1,2	12,6 ± 1,0* (64,8 ± 5,0) [#]
NO ₂ ⁻ сечі, мкмоль/л % до контролю	8,79 ± 0,37	4,14 ± 0,66* (47,1 ± 7,5)	10,19 ± 0,42	2,97 ± 0,34* (29,2 ± 3,3) ^{##}
NO ₃ ⁻ сечі, мкмоль/л % до контролю	52,2 ± 1,6	32,5 ± 3,0* (62,2 ± 5,7)	59,7 ± 1,9	27,3 ± 1,5* (45,7 ± 2,5) ^{##}

П р и м і т к а. * — відхилення значуще порівняно з контролем, $p \leq 0,05$; ** — відхилення близьке до значущого порівняно з контролем, $0,05 < p \leq 0,1$; # — відхилення значуще при порівнянні груп « β -ФЕСА» і «2-ГФСА», $p \leq 0,05$; ## — відхилення близьке до значущого при порівнянні груп « β ФЕСА» і «2-ГФСА», $0,05 < p \leq 0,1$; АОЗ — антиоксидантний захист, NO — оксид азоту, GSH — глутатіон відновлений, GSSG — глутатіон-окислений, ГР — глутатіонредуктаза, ГП — глутатіонпероксидаза, ГТ — глутатіонтрансфераза, СОД — супероксиддисмутаза, NOS — синтаза оксиду азоту, NO₂⁻ — нітрит-аніон, NO₃⁻ — нітрат-аніон.

сті ГП, можливо, обумовлено гальмуванням NO-синтазного шляху метаболізму NO, що характеризується зниженням у 1,5 рази активності NOS, на 18% і 17% рівня NO₂⁻ і NO₃⁻ (табл. 2).

Вміст метаболітів NO у печінці знижується повільніше, ніж активність NOS, завдяки, очевидно, можливості їх часткового відновлення у нітрит/нітрат редуказних реакціях замкненого циклу обміну NO або за рахунок інших компенсаторних механізмів, що співпадає з існуючими даними [16].

За дії 2 ГФСА і β -ФЕСА зареєстровано зниження вмісту NO₂⁻ і NO₃⁻ у плазмі крові та сечі, що більш виражено у першому випадку (табл. 2). Ці зміни, ймовірно, обумовлені інгібуванням конститутивної NOS печінки, на що може впливати β -ФЕСА, а також NOS ендотелію судин та тромбоцитів.

Встановлено, що за впливу досліджених сукцинамідів більше знижується рівень NO₂⁻, ніж NO₃⁻ у плазмі крові, а крім того вміст обох цих метаболітів NO більше падає у сечі, ніж у плазмі крові (табл. 2). Відомо, що саме вміст NO₂⁻ у плазмі крові значною мірою залежить від ступеня актив-

ності ендотеліальної NOS (eNOS) та є пропорційним загальному ендотеліальному синтезу NO, порівняно з іншими метаболітами NO. Молекула NO₂⁻ є більш реакційноспроможною, ніж NO₃⁻, і тому залучена у широке коло метаболічних перетворень, що також позначається на більшому падінні її вмісту [17]. На рівень NO₂⁻ і NO₃⁻ у позаклітинній рідині може впливати не тільки інтенсивність продукції NO, а і темпи ниркового кліренсу згідно з сучасними уявленнями [18]. В наших дослідженнях гальмування темпів сечової екскреції NO₂⁻ і NO₃⁻, ймовірно, пов'язано з посиленням їх каналіцевої реабсорбції у проксимальному сегменті нефрону, що запобігає суттєвій втраті організмом NO у вигляді цих аніонів. Такий вид активності, що пов'язаний із стимуляцією внутрішньониркових механізмів регуляції системи NO-NOS, є більш вираженим за дії 2-ГФСА порівняно з β -ФЕСА.

Згідно з отриманими даними метаболіти β -ФЕСА-ОСАКС: 2-ГФСА та β -ФЕСА у субтоксичних дозах викликають збільшення рівня продуктів ПОЛ і ОМП, що може свідчити про підвищення активності ВРО в організмі. Особливістю їх дії на стан

АОЗ у субтоксичних дозах є інгібування ГП, але паралельно відбувається компенсаторна активація інших складових АОЗ, що сприяє зниженню ймовірності ушкодження мембран клітин печінки та еритроцитів внаслідок атаки ВР та пероксидів на ліпідні та протеїнові молекули. Обидва метаболіти β -ФЕА-ОСАКС також здатні уповільнювати метаболізм NO в організмі щурів. Отримані нами дані узгоджуються з літературними про провідну роль вільнорадикальних процесів та механізмів антиоксидантного захисту у розвитку інтоксикації ксенобіотиками [2, 3].

Відомо, що посилення окисної деградації білків та ліпідів, може бути наслідком генерації АФК, що відбувається при активації окремих ланок дихального ланцюга мітохондрій. Дія сукцинамідів може реалізуватися і за рахунок їх субстратної активності, оскільки їх компонентом є сукцинат. Це підтверджують наші дані про те, що 2-ГФСА, як і його вихідна сполука — β -ФЕА-ОСАК, у субтоксичній дозі інгібує мітохондріальну сукцинатдегідрогеназу, яка поставляє FADH₂ у дихальний ланцюг мітохондрій, передаючи атоми водню через коензим Q [19].

Порівняння ефектів метаболітів β -ФЕА-ОСАК методом Т'юкі дозволило встановити, що більше зростання інтенсивності ПОЛ, ОМП та активності ензимів АОЗ

в організмі щурів відбувається в умовах введення β -ФЕСА порівняно з 2-ГФСА. Проте за критерієм зниження рівня метаболітів NO в плазмі крові та сечі β -ФЕСА поступається 2-ГФСА (табл. 1, 2).

Проведено кореляційний аналіз показників ОМП, ПОЛ, системи АОЗ та метаболізму NO, які зазнали змін в умовах субхронічного введення сукцинамідів. В результаті підтверджено взаємозв'язок інтенсивності ПОЛ і ОМП, з одного боку, та активністю систем АОЗ і NO-NOS — з іншого. За дії β -ФЕСА підвищення рівня GSH, активності КАТ та ГР залежить від збільшення спонтанного рівня фракцій КП₅₃₀, КП₃₇₀ і КП₄₃₀, відповідно, у печінці ($r=0,73$; $0,83$; $0,7$), а інгібування ГП пов'язано з інтенсивністю ПОЛ у печінці ($r=0,85$). У випадку 2-ГФСА визначено залежність дисбалансу в системі КАТ-ГП та інтенсивністю спонтанної ОМП ($r=0,83$). В умовах застосування даних сполук у субтоксичних дозах встановлено зв'язок між гальмуванням метаболізму NO та накопиченням у печінці та сироватці КП різних фракцій ($r=0,7 \div 0,9$).

Таким чином, критеріями оцінки можливого несприятливого впливу досліджених сукцинатвмісних сполук на оксидативний статус у субтоксичних дозах можна вважати підвищення активності спонтанного ОМП та ПОЛ, зниження рівня метаболітів NO та активності ГП.

ВИСНОВКИ

1. Метаболіти β -фенілетиламіду 2-оксисукцинанілової кислоти: 2-гідроксифенілсукцинамід і β -фенілетилсукцинамід, у субтоксичних дозах стимулюють утворення продуктів пероксидного окиснення ліпідів, що сполучене у випадку першого метаболіту з інтенсифікацією спонтанної та Fe²⁺-індукованої окислювальної модифікації протеїнів у цілісному організмі, за введення другого — спонтанного рівня різних фракцій карбонільованих протеїнів у печінці. Встановлено прямий зв'язок інтенсивності пероксидно-

- го окиснення ліпідів з рівнем фракції карбонільованих протеїнів-530.
2. Досліджені похідні янтарної кислоти у субтоксичних дозах здатні порушувати баланс в системі антиоксидантного захисту за рахунок інгібування глутатіонпероксидази, яке певною мірою компенсується підвищенням активності каталази та глутатіонредуктази.
3. Особливістю дії β -фенілетилсукцинамідів є інгібуючий вплив на NO-синтазу печінки, що певним чином позначається на зниженні рівня нітрит- і нітрат-аніонів у печінці, плазмі кро-

ві та сечі. За впливу 2-гідроксифенілсукцинамиду зниження активності NO-синтази менш виражено, але має пряму кореляцію з рівнем нітритів і нітратів у плазмі крові та сечі. Зниження активності оксидазотної системи пов'язано із змінами активності ензимів антиоксидантного захисту: глутатіонпероксидази, каталази і глутатіонредуктази, які впливають на інтенсивність процесів пероксидного окиснення протеїнів і ліпідів.

4. Критеріями дії сукцинатвмісних сполук у вигляді метаболітів β -фенілетиламіду 2-оксисукцинанілової кисло-

ти на оксидативний статус у субтоксичних дозах є підвищення активності спонтанної окислювальної модифікації протеїнів та пероксидного окиснення ліпідів, зниження рівня метаболітів оксиду азоту та активності глутатіонпероксидази. З двох метаболітів β -фенілетилсукцинамід більшою мірою здатний підвищувати інтенсивність вільнорадикального окиснення, як і одночасно активність ензимів антиоксидантного захисту, але поступається 2-гідроксифенілсукцинамиду за критерієм гальмування обміну оксиду азоту.

ЛІТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Gorbenko NI. Patogenetychne obg'runtuvannja efektyvnosti pohidnogo jantarnoi' kysloty — fensukcynalu v terapii' cukrovogo diabetu ta jogo sudynnyh uskladnen' (eksperymental'ne doslidzhennja), *Harkiv*, 2004: 36 p.
2. Dubinina EE, Pustygina AV. *Ukr Biohim Zhurn* 2008; 80(6):5-18.
3. Shumaev KB. Rol' dinitrozil'nyh kompleksov zheleza v zashhite biomolekul i kletochnyh struktur ot okislitel'nogo, nitrozativnogo i karbonil'nogo stressov (jeksperimental'noe issledovanie), *Moskva*, 2010: 38 p.
4. Placer Z, Vidlakova M, Kupila L. *Chehosl Med Obzor* 1970; 16(1):30-34.
5. Asakawa T, Matsushite S. *Lipids* 1980; 15:137-140.
6. Stal'naja ID, Garishvili TG. *Sovremennye metody v biohimii*, pod red. VN. Orehovicha, *Moskva*, 1977:66-68.
7. Arutjunjan AV, Dubinina EE, Zybina NN. *Metody ocenki svobodnoradikal'nogo okislenija i antioksidantnoj sistemy organizma: metod. rekomendacii*, *Sankt-Peterburg*, 2000: 104 p.
8. Misheneva VS, Gorjuhina TA. *Vopr Onkologii* 1968; 14(10):46-49.
9. Ovsjannikova LM, et al. *Biohimichni ta biofizychni metody ocinky porushen' okysljuval'nogo gomeostazu v osib, shho zaznaly radiacijnogo vplyvu vnaslidok avarii' na ChAES: metod. rekomendacii'*, *Kyiv*, 1999:7-9.
10. Koroljuk MA, Ivanova LI, Majorova IG, Tokarev VE. *Lab Delo* 1988; 1:16-19.
11. Solodkov AP, et al. *Fotometricheskij metod opredelenija nitratov i nitritov v biologicheskikh gidkostjakh: instrukcija po primeneniju*, *Vitebsk*, 2001: 9 p.
12. Sumbaev VV, Jasinskaja IM. *Sovrem Probl Toksikologii* 2000; 3:3-7.
13. Gasparov VS, Degtjar' VG. *Biohimija* 1994; 59(6):763-775.
14. Kravec EB. *Bjul Cibir Medicyny* 2005; 1:9-18.
15. Gozhenko AI, Andrejcovna NI, Kvasnickaja OB. *Aktual'nye Problemy Transportnoj Medicyny* 2009; 4(18):8-18.
16. Reutov VP, Gozhenko EA, Ohotin VE, et al. *Aktual'nye Problemy Transportnoj Medicyny* 2007; 4(10):89-112.
17. Sybirna NO, Ljuta MJa, Klymyshyn NI. *Biologichni Studii'* 2010; 4(1):143-160.
18. Horita S, Nakamura M, Shirai A, et al. *J World Nephrol* 2014; 3(4):295-301.
19. Kudrja MJa, Palagina IA, Mishhenko TV, et al. *Probl Endokryn Patologii'* 2012; 4:109-115.

ВПЛИВ МЕТАБОЛІТІВ АНТИДІАБЕТИЧНОГО ЗАСОБУ НА СТАН ПРОЦЕСІВ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ, СИСТЕМ ОБМІНУ ОКСИДУ АЗОТУ ТА АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ

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

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків
lab-tox@ukr.net

Досліджено біологічну активність метаболітів антидіабетичного засобу (АДЗ) — похідних янтарної кислоти в умовах їх субхронічного перорального введення. Визначено вміст продуктів вільнорадикального пероксидного окиснення (ВРПО) протеїнів і ліпідів, рівень стабільних метаболітів оксиду азоту та активність антиоксидантної системи в організмі щурів. Встановлено, що метаболіти АДЗ у субтоксичних дозах викликають підвищення інтенсивності ВРПО, що взаємопов'язано із змінами активності ключових ензимів антиоксидантного захисту у печінці та сироватці крові. Вплив даних сполук призводить до зниження рівня нітрит- і нітратаніонів, що також позначається на змінах стану ВРПО у печінці та сироватці крові. Зміни про-/антиоксидантного та оксидазотного гомеостазу є критеріями оцінки токсичної дії метаболітів АДЗ.

Ключові слова: похідні янтарної кислоти, пероксидне окиснення, антиоксидантна система, оксид азоту, токсичність.

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ АНТИДИАБЕТИЧЕСКОГО СРЕДСТВА НА СОСТОЯНИЕ ПРОЦЕССОВ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ, СИСТЕМ ОБМЕНА ОКСИДА АЗОТА И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ

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

ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины»,
г. Харьков
lab-tox@ukr.net

Исследовали биологическую активность метаболитов антидиабетического средства (АДС) — производных янтарной кислоты в условиях их субхронического перорального введения. Определено содержание продуктов свободнорадикального пероксидного окисления (СРПО) протеинов и липидов, уровень стабильных метаболитов оксида азота и активность антиоксидантной системы в организме крыс. Установлено, что метаболиты АДС в субтоксических дозах вызывают повышение интенсивности СРПО, что взаимосвязано с изменениями активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты в печени и сыворотке крови. Влияние данных соединений приводит к снижению уровня нитрит- и нитратанионов, что также сказывается на изменениях состояния СРПО в печени и сыворотке крови. Изменения про-/антиоксидантного и оксидазотного гомеостаза являются критериями оценки токсического действия метаболитов АДС.

Ключевые слова: производные янтарной кислоты, пероксидное окисление, антиоксидантная система, оксид азота, токсичность.

IMPACT OF AN ANTIDIABETIC DRUG METABOLITES ON THE STATE OF THE LIPID PEROXIDATION PROCESSES, NITROGEN OXIDE EXCHANGE AND ANTI-OXIDANT PROTECTION SYSTEMS

I. A. Palagina, M. Y. Kudrya, O. S. Lalyenko, N. V. Melnikovskaya, N. V. Ustenko

*SI «V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine», Kharkiv
lab-tox@ukr.net*

It was studied the biological activity of an antidiabetic drug (ADD) metabolites representing the succinic acid derivatives within their subchronic per oral introduction. It was defined, i) the content of the proteins and lipids free-radical peroxide oxidation (FRPO) products, ii) the level of the nitrogen oxide stable metabolites, and iii) the activeness of the anti-oxidant system in the rats' organism. It was found that the ADD metabolites in sub-toxic doses were able to cause the elevation of the FRPO intensiveness interconnected with the changes of the key antioxidant protection enzymes in the liver and blood serum. Impact of these compounds proved to lead to a decrease of the nitrite- and nitrate-anions levels and so forth to additionally change the FRPO state in the liver and blood serum. It was concluded in stating that the specified changes of pro-/antioxidant and nitrogen oxide homeostasis may serve as estimation criteria of the ADD metabolites toxic impact.

Key words: succinic acid derivatives, peroxide oxidation, antioxidant system, nitrogen oxide, toxicity.