



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

## ВПЛИВ 2-ГІДРОКСИФЕНІЛСУКЦИНАМІДУ НА МЕТАБОЛІЗМ ОКСИДУ АЗОТУ ТА СИСТЕМУ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ У ЩУРІВ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ УМОВАХ

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

**Ключові слова:** оксид азоту, антиоксидантний захист, 2-гідроксифеніл-сукцинамід.

**Ключевые слова:** оксид азота, антиоксидантная защита, 2-гидрокси-фенилсукцинамид.

**Key words:** nitric oxide, antioxidant protection, 2-hydroxyphenyl-succinamide.

Досліджено субхронічний вплив 2-гідроксифенілсукцинамиду, метаболіту антидіабетичного засобу фенсукцинала, на обмін оксиду азоту та систему антиоксидантного захисту у щурів. Встановлено, що 2-гідроксифенілсукцинамід викликає зниження активності NO-синтази, продукції  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  та адаптивне зменшення активності системи антиоксидантного захисту в організмі за цих умов. Утворення даного метаболіту може впливати на прояви антиокислювальної активності самого лікарського засобу при його цільовому застосуванні.

Исследовано субхроническое воздействие 2-гидроксифенилсукцинамида, метаболита антидиабетического средства фенсукцинала, на обмен оксида азота и систему антиоксидантной защиты у крыс. Установлено, что 2-гидроксифенилсукцинамид вызывает снижение активности NO-синтазы, продукции  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  и адаптивное уменьшение в этих условиях активности системы антиоксидантной защиты в организме. Образование данного метаболита может влиять на проявления антиокислительной активности самого лекарственного средства при его целевом использовании.

Paper studies a subchronic impact of 2-hydroxyphenylsuccinamide (2-HPSA) – the antidiabetic drug Phensuccinal metabolite – on state of the nitric oxide metabolism and antioxidant protection (AOP) system in rats. We found that 2-HPSA proved to deactivate the NO-synthase, reduce the  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  production and under these conditions decrease the AOP system activeness of an organism. We concluded that this metabolite formation may change the effects of the initial drug antioxidant activeness under its aim using.

Нині встановлено, що при цукровому діабеті (ЦД) суттєво підвищується активність процесів вільнорадикального окислення (ВРО) у тканинах та органах, значно перевищуючи здатність системи антиоксидантного захисту (АОЗ) протидіяти надлишковому утворенню вільних радикалів. Такі порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу віддзеркалюють ступінь ендогенної інтоксикації та відіграють ключову роль у розвитку ускладнень цього захворювання [1]. Сучасними дослідженнями доведено, що у регуляції вільно-радикальних процесів і механізмів антиоксидантного захисту одне з важливих місць належить оксиду азоту (NO), що утворюється у багатьох клітинах організму [2]. Отже, рівновага в системі ВРО/АОЗ значною мірою залежить від ступеня активації NO-синтази (NOS) та рівня продукції NO, що може змінюватись під впливом окремих ксенобіотиків, у тому числі, лікарських засобів [3].

У ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України» розроблено оригінальний антидіабетичний засіб  $\beta$ -фенілетил-амід 2-оксисукцинанілової кислоти (фенсукцинал), що має виразну антигіперглікемічну та антиоксидантну активність. Цей лікарський засіб призначений для профілактики ЦД, корекції інсулінорезистентних станів і гальмування розвитку діабетичних ускладнень. Враховуючи зазначене, певний інтерес становило з'ясування можливих шляхів біотрансформації фенсукцинала з визначенням його активних метаболітів, що зумовлюють той чи інший вид активності самого фенсукцинала. Нині встановлено, що

у I фазі перетворення фенсукцинала внаслідок реакції гідролізу можливе утворення одного з його метаболітів, 2-гідроксифенілсукцинамиду (2-ГФСА), що, імовірно, може впливати на біологічну активність самого лікарського засобу. У зв'язку з цим, актуальними є дослідження особливостей дії 2-ГФСА на стан прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу.

### МЕТА РОБОТИ

Визначити роль змін показників обміну оксиду азоту та системи антиоксидантного захисту у щурів на біологічну активність 2-ГФСА в умовах субхронічного надходження.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експерименти здійснено на 26 статевозрілих нелінійних білих щурах-самцях. Маніпуляції з тваринами, що викликають стрес, дискомфорт і біль, здійснювали з дотриманням «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах». Особливості біологічної дії 2-ГФСА досліджували в умовах субхронічного (30-разового) перорального введення розчину сполуки в дозі 17 мг/кг маси тіла (м.т.), яку розраховували як еквімолярну ефективній дозі фенсукцинала (25 мг/кг м.т.). Контрольні тварини отримували еквівалентний об'єм розчинника. Після закінчення експерименту тварин забивали методом декапітації під легким ефірним наркозом. Отримували біосубстрат: плазму крові, гемолізат еритроцитів, сечу, гомогенат печінки.

Інтенсивність метаболізму оксиду азоту оцінювали за рівнем нітритів ( $\text{NO}_2^-$ ) та нітратів ( $\text{NO}_3^-$ ) у плазмі крові, сечі та тканині печінки спектрофотометричним методом



з використанням реактиву Гриса [4]. Активність NOS (КФ 1.14.13.19) визначали у гомогенаті печінки за швидкістю окислення NADPH у реакційній суміші: 0,1 М трис-НСІ буфер (рН=7,4), 10 мМ СаСІ<sub>2</sub>, 40 мМ водний розчин аргініну, 1 мМ водний розчин NADPH, до якої додавали 0,1 мл гомогенату печінки. Гомогенат готували на дистильованій воді у розведенні 1:10. Загальний об'єм проби складав 3 мл. У контрольні проби замість розчину NADPH додавали дистильовану воду. Реєстрували зниження екстинкції дослідних проб, які вимірювали проти контрольних, при 340 нм протягом 5-хвилинної інкубації при 40°C. Активність NOS виражали у нмоль NADPH/хв·1 мг білка [5].

Стан системи АОЗ оцінювали за наступними показниками: рівень загальної антиокислювальної активності (ЗАА) [6] та вміст відновленого глутатіону (ВГл) у сироватці крові [7], активність каталази (КФ 1.11.1.6) у сироватці крові та гомогенаті печінки [8], активність глутатіонзалежних ферментів – глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9), глутатіонредуктази (КФ 1.6.4.2) у гемолізаті крові [9] та глутатіонтрансферази (КФ 2.5.1.18) у гомогенаті печінки [10]. Для розрахунку активності ферментів визначали концентрацію загального гемоглобіну крові та концентрацію білка в гомогенаті печінки за методом М. Бредфорда.

Статистичну обробку даних проводили із застосуванням t-критерія Стьюдента за допомогою пакета програм StatisticSoft 7.0.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що в умовах субхронічного введення

2-ГФСА у піддослідних щурів на 41% знижується сумарна активність NOS у гомогенаті печінки (p<0,05), що відбувається, ймовірно, за рахунок її конститутивної форми. Пригнічення активності ферменту, у свою чергу, суттєво позначається на метаболізмі NO, віддзеркаленням чого є інтенсивність утворення його стабільних кінцевих метаболітів. Зокрема, за даних умов експерименту рівень NO<sub>2</sub><sup>-</sup> та NO<sub>3</sub><sup>-</sup> у плазмі крові піддослідних щурів був на 70% та 45% відповідно нижчим, ніж у групі контролю (p<0,05). Зниження концентрації аніонів NO<sub>2</sub><sup>-</sup> було виразнішим порівняно з аніонами NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, що в основному виводяться з організму (табл. 1).

Зміни рівня метаболітів NO у плазмі можуть бути зумовлені взаємодією високореакційного NO з низько- та високомолекулярними тілами та депонуванням його в тканинах у формі S-нітрозотіолів, а також ковалентним зв'язуванням з іншими вільними радикалами, завдяки чому NO може як активувати ланцюгові реакції ВРО, так і інгібувати їх. Крім того, NO може вступати у взаємодію з протеїнами та низькомолекулярними сполуками, що в активному центрі містять іони перемінних металів, від чого також може залежати концентрація його кінцевих метаболітів [11]. Зниження продукції NO за впливу 2-ГФСА, ймовірно, є одним із факторів гальмування реакцій ВРО в організмі щурів. Останнє підтверджується виявленням за даних умов експозиції зниженням у сироватці крові рівня продуктів спонтанного та Fe<sup>2+</sup>-індукованого пероксидного окислення білків на 24%, 33% відповідно (p<0,05) на фоні зменшення кількості субстрату для окислення.

Таблиця 1

Показники стану обміну оксиду азоту та системи антиоксидантного захисту у щурів за умов субхронічного впливу 2-ГФСА, ( $\bar{X} \pm S\bar{X}$ )

Показник	n	Контроль	N	Дослід
Нітрат –аніон (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ):				
– плазма крові, мкмоль/л	7	21,87±0,307	7	11,98±0,55*
– сеча, мкмоль/л	10	63,53±2,18	11	61,89±1,33
– печінка, нмоль/мг білка	5	48,28±0,66	5	49,2±1,11
Нітрит-аніон (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ):				
– плазма крові, мкмоль/л	7	3,99±1,037	7	1,2±0,09*
– сеча, мкмоль/л	10	9,43±0,43	11	8,97±0,22
– печінка, нмоль/мг білка	5	44,37±0,29	5	46,22±1,05
Активність NOS (V <sub>max</sub> ), нмоль NADPH/хв×мг білка	5	2,19±0,16	5	1,30±0,14*
Глутатіон відновлений крові, мг/100 мл	7	22,1±2,8	7	13,2±1,71*
Глутатіонпероксидаза гемолізату еритроцитів, мкмоль/хв× г Hb	7	147,9±13,9	6	127,8±12,7
Глутатіонредуктаза гемолізату еритроцитів, мкмоль НАДФН /хв ×г Hb	8	3,03±0,43	7	4,10±0,242**
Глутатіон- S-трансфераза печінки, нмоль/ хв ×мг білка	6	70,0±9,8	6	66,1±4,7
Активність каталази:				
– сироватка, мкат/л×хв	8	9,4±0,6	8	7,7±0,41*
– печінка, мкат/г×хв	5	3,2±0,8	7	5,9±0,51*
ЗАА сироватки крові, %	8	48,3±2,8	8	31,4±3,31*

Примітки: \* – відхилення значуще (p<0,05); \*\* – відхилення близьке до значущого (0,05<p<0,1).



При вивченні інтенсивності метаболізму NO у печінці за впливу 2-ГФСА не виявлено змін вмісту  $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$  у тканинному пулі (табл. 1). Втім, незважаючи на пригнічення активності NOS, концентрація кінцевих метаболітів NO у тканині печінки залишалась стабільною, очевидно, завдяки високим резервно-адаптаційним можливостям органу та циклічності метаболізму NO. Якщо припустити зниження ролі NO-синтазного механізму в регуляції концентрації NO, що суттєво залежить від концентрації кисню та його активних радикалів, то для підтримки стабільної концентрації метаболітів NO певне значення могла мати активація нітрит-/нітратредуктазної ланки замкненого циклу метаболізму NO за принципом зворотного зв'язку, а можливо, й інших компенсаторних механізмів, що регулюють вміст NO. Зокрема відомо, що у тканині печінки це може реалізуватись за рахунок цитохромоксидази мітохондрій і цитохрому  $\text{P}_{450}$  мікросом, що, взаємодіючи з киснем, у дезоксиформі здатні відновлювати  $\text{NO}_2^-$  в NO [12].

Рівень екскреції  $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$  через нирки з сечею у піддослідних щурів залишався незмінним відносно контролю (табл. 1). Нирки – це важливий канал виведення водорозчинних метаболітів NO з організму, але слід враховувати, що показники їх екскреції є сумарними величинами, які віддзеркалюють інтенсивність синтезу NO ендотелієм кровеносних судин і тканин, включаючи ниркову перенхіму [13–15]. Цей факт певною мірою може пояснювати відсутність змін вмісту метаболітів NO в сечі. Крім того, не можна виключати можливість послідовного відновлення  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  в ендотелії нирок завдяки нітрат- і нітритредуктазним реакціям циклу NO. Збереження нормальної екскреції метаболітів NO може бути пов'язано з їх захисною роллю у непошкоджених нефронах і клубочках, запобіганням порушенням основних ниркових функцій. На сучасному етапі відбувається активне накопичення даних щодо ниркового метаболізму NO у нормі та за різної патології, тому остаточні висновки щодо результатів наших досліджень робити передчасно.

При аналізі показників стану системи АОЗ (табл. 1) встановлено, що в умовах субхронічного введення 2-ГФСА знижується ЗАА сироватки крові на 35% порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ), що значною мірою відбувається за рахунок ВГл – неферментного компонента першої лінії антиоксидантного захисту, вміст якого у сироватці зменшується на 40% відносно контрольних значень ( $p < 0,05$ ). Водночас у гемолізаті еритроцитів зареєстровано тенденцію ( $0,05 < p < 0,1$ ) до підвищення на 35% активності глутатіонредуктази, що каталізує NADPH залежне відновлення окисленого глутатіону (ОГл) до ВГл. Зміни активності даного глутатіон-залежного ферменту можна оцінити як компенсаторну реакцію організму, що індукована падінням рівня ВГл і спрямована на поступове відновлення балансу ОГл/ВГл. Тобто в системі глутатіону виявлено зміни, напрямом яких свідчить про функціональну єдність ензимів системи глутатіону, що забезпечує підтримку тіолдисульфідного балансу та необхідний для організму рівень антиоксидантного захисту. Швидкість реакцій глутатіонової

кон'югації, що відіграють важливу роль у детоксикації та метаболізмі як ксенобіотиків, так і ендогенних сполук, не змінювалась, виходячи з відсутності змін активності глутатіон-S-трансферази у гомогенаті печінки (табл. 1).

За впливу 2-ГФСА у системі АОЗ також мало місце зниження активності каталази (на 18% відносно контролю,  $p < 0,05$ ), що каталізує розклад  $\text{H}_2\text{O}_2$ , окислення низькомолекулярних спиртів і нітритів. Отже, зниження активності системи АОЗ, викликане пригніченням утворення метаболітів NO, продуктів пероксидного окислення білків у сироватці крові, можна охарактеризувати як адаптивні зміни.

У печінці щурів, які отримували 2-ГФСА, навпаки, виявляли суттєве підвищення активності каталази майже на 84% ( $p < 0,05$ ), що, очевидно, пов'язано з необхідністю компенсації виявленої активації спонтанної та  $\text{Fe}^{2+}$ -індукованої окислювальної модифікації білків на 75% і 70% відповідно ( $p < 0,05$ ) та спрямоване на зниження інтенсивності цих процесів.

## ВИСНОВКИ

1. 2-гідроксифенілсукцинамід – один із визначених метаболітів антидіабетичного засобу фенсукцинала в умовах субхронічного введення в дозі 17 мг/кг м.т. викликає зниження активності NO-синтази і, як наслідок, зменшення концентрації  $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$  у плазмі крові, що може сприяти уповільненню процесів вільнорадикального окислення в організмі загалом.

2. Субхронічне введення 2-гідроксифенілсукцинамиду (17 мг/кг м.т.) призводить до зниження активності системи антиоксидантного захисту у сироватці крові, в першу чергу, за рахунок відновленого глутатіону, що, очевидно, є адаптивними змінами в умовах пригнічення окислювальних процесів в організмі. Проте у печінці цей метаболіт, навпаки, проявляє стимулюючу дію на компоненти системи антиоксидантного захисту, викликаючи, зокрема, суттєве підвищення активності каталази, що є компенсаторною реакцією на інтенсифікацію вільнорадикального окислення в організмі.

3. 2-гідроксифенілсукцинамід, метаболіт I фази біотрансформації фенсукцинала, певною мірою може впливати на прояви антиокислювальної активності цього лікарського засобу при цільовому застосуванні, уповільнюючи процеси вільнорадикального окислення або запобігаючи їх розвитку.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Балаболкин М.Н. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений диабета / М.Н. Балаболкин, Е.М. Клебанова // Проблемы эндокринологии. – 2000. – №6. – С. 29–34.
2. Зенков Н.К. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Менишкова – М.: Наука/Интерпериодика, 2001. – 343 с.
3. Сибірна Н.О. Активність різних ізоформ NO-синтази еритроцитів за цукрового діабету 1 типу / Н.О. Сибірна, В.А. Бурда, М.Я. Люта // Клінічна та експериментальна патологія. – 2004. – Т. 3, №2. – С. 210–212.
4. 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.



5. 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.
6. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: Метод. реком. / Рос. Акад. мед. наук; [авт. А.В. Арутюнян и др.] – СПб., 2000. – С. 76.
7. Мишенева В.С. Наличие глютатиона в нормальных и опухолевых тканях человека и животных / В.С. Мишенева, Т.А. Горюхина // *Вопр. онкологии*. – 1968. – Т. 14, №10. – С. 46–49.
8. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // *Лаб. дело*. – 1988. – №1. – С. 16–19.
9. Біохімічні та біофізичні методи оцінки порушень окислювального гомеостазу в осіб, що зазнали радіаційного впливу внаслідок аварії на ЧАЕС: Метод. реком. / М-во охорони здоров'я України, Акад. мед. наук України; [авт. Л.М. Овсяннікова та ін.] – К., 1999. – С. 7–9.
10. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: Метод. реком. / Рос. Акад. мед. наук; авт. А.В. Арутюнян и др.] – СПб., 2000. – С. 76.
11. Ванин А.Ф. Оксид азота – регулятор клеточного метаболизма / А.Ф. Ванин // *Соросовский образовательный журнал*. – 2001. – Т. 7, №11. – С. 7–12.
12. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, В.Е. Охотин, Н.С. Косицин [и др.] – М.: Наука, 1998. – 156 с.
13. Goldfrey M. Renal handing of circulating nitrates in anesthetized dogs / M. Goldfrey, D.S. Majid // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 1998. – Vol. 275, №1. – P. F68–F73.
14. Liang M. Production and functional roles of nitric oxide in the proximal tubule / M. Liang, F.G. Knox // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 1999. – Vol. 278, №5. – P. R1117–R1124.
15. Ocamoto M. Nitrite-derived nitric oxide formation following ischemia-reperfusion injury in kidney [Текст] / M. Ocamoto, K. Tsuchiya, Y. Kanematsu // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2005. – Vol. 288, №1. – P. F182–F187.

**Відомості про авторів:**

Палагіна І.А., к. біохім. н., ст. н. с. лаб. токсикології та гігієнічного регламентування лікарських засобів ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України».

Лалименко О.С., м. н. с. лаб. токсикології та гігієнічного регламентування лікарських засобів ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України».

Кудря М.Я., зав. лаб. токсикології та гігієнічного регламентування лікарських засобів, канд. біол. наук, ст. н. с. ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України».

Мельниківська Н.В., к. біол. н., ст. н. с. лаб. токсикології та гігієнічного регламентування лікарських засобів ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України».

**Адреса для листування:**

Палагіна Ірина Анатоліївна. 61002, м. Харків, вул. Артема 10.

Тел.: (057) 700 45 36.

E-mail: [lab-tox@ukr.net](mailto:lab-tox@ukr.net)

Поступила в редакцію 22.03.2012 г.