

Роль метаболітів оксиду азоту при дії субтоксичних доз сукцинамідів на стан гемостазу

І.А. Палагіна, М.Я. Кудря, О.С. Лалименко

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

Вивчали роль змін обміну ендogenous оксиду азоту (NO) при дії амідів бурштинової кислоти – продуктів біотрансформації антидіабетичного засобу на стан гемостазу. В експерименті на щурах застосовували синтезовані сукцинаміди в еквімолярних кількостях щодо субтоксичної дози фармацевтичної субстанції. Визначали показники, які характеризують стан тромбоцитарного та коагуляційного гемостазу у плазмі крові, вміст стабільних метаболітів NO та активність синтази оксиду азоту (NOS) у гомогенаті печінки, плазмі крові та сечі щурів. Встановлено, що в умовах субхронічного введення сукцинамідів зменшується концентрація нітрит- та нітрат-аніонів у плазмі крові (на 30-50 і 20-35% відповідно), печінці (на 16-19 і 14-18%) та сечі (на 50-70 і 38-55%). Важливим чинником цих змін є зниження активності NOS (на 33%). Досліджені сполуки за цих умов підвищують у 1,5 раза коагуляційний потенціал плазми крові та можуть підсилювати на 20% агрегацію тромбоцитів. Аналіз коефіцієнтів парної кореляції показав наявність зв'язків змін показників метаболізму NO та гемостазу. Отримані результати свідчать про те, що прояв прокоагуляційної та тромбогенної дії сукцинамідів за умов їх застосування у субтоксичних дозах певною мірою зумовлений зменшенням вазоактивного пулу NO, що, у свою чергу, відбувається за рахунок зниження активності NOS.

Ключові слова: оксид азоту; гемостаз; аміди бурштинової кислоти.

ВСТУП

Відомо, що цукровий діабет (ЦД) супроводжується порушеннями судинно-тромбоцитарної та коагуляційної ланок гемостазу на тлі ендотеліальної дисфункції, що суттєво прискорює розвиток серцево-судинних ускладнень [1]. Проблема фармакологічної корекції змін у системі гемостазу за цієї патології залишається до кінця не вирішеною, досліджень у такому напрямку недостатньо. Наразі вивчається антитромбогенний потенціал гіпоглікемічних препаратів, для деяких (бігуаніди, тіазолідиндіони) встановлено прямий вплив на гемостаз. Літературні дані підтверджують наявність у низки заміщених амідів та гідразидів дикарбонових кислот (бурштинової, малеїнової, фталевої) антикоагуляційної або рідше гемостатичної активності, але коло таких сполук незначне [2].

© І.А. Палагіна, М.Я. Кудря, О.С. Лалименко

З'ясовано, що сукцинатвмісні сполуки здатні запобігати прогресуванню дисфункції ендотелію, підвищуючи синтез і біодоступність ендogenous оксиду азоту (NO), та чутливість ендотеліоцитів до нього [3]. В аспекті вивчення механізмів дії на гемостаз, асоційованих із змінами метаболізму NO, певний інтерес представляють сполуки з антидіабетичною активністю, які є похідними бурштинової кислоти.

Оригінальною сполукою з антидіабетичними властивостями є β -фенілетиламід 2-оксисукцинанілової кислоти (β -ФЕА-ОСАК), механізми дії якого пов'язані з поліпшенням біоенергетичних процесів, пригніченням оксидативного стресу і зниженням неферментативного глікозилювання [4]. На моделі метаболічного синдрому виявлено антикоагуляційну активність цієї сполуки в дозі 50 мг/кг (перорально) [5]. Визначені метаболіти

І фази біотрансформації β -ФЕА-ОСАК: 2-гідроксифенілсукцинамід (2-ГФСА) і в-фенілетилсукцинамід (β -ФЕСА), які також є похідними бурштинової кислоти і можуть впливати на специфічні та токсичні ефекти вихідної сполуки.

Дослідженнями останніх років показано, що у регуляції судинного тонуусу, реологічного стану крові, плазмового та тромбоцитарного гемостазу бере активну участь система NO. Едогенний NO є сильним нейрогенним вазодилататором, який у фізіологічних умовах гальмує агрегацію тромбоцитів та лімфоцитарно-тромбоцитарну адгезію, підвищує фібринолітичну активність та підтримує коагуляційний потенціал крові [6, 7]. Будь-які відхилення у продукції NO та дисбаланс активних форм азоту можуть відобразитися на стані гемостазу, що проявляється порушеннями коагуляції, широким спектром тромботичних або геморагічних ускладнень при патологічному процесі [8, 9]. Прояв захисної або пошкоджувальної дії NO пов'язують з утворенням великої кількості продуктів його метаболізму, які мають різну біологічну активність [10]. Нині чітких уявлень стосовно впливу цієї молекули та її метаболітів на механізми гемостазу немає.

У розвитку ЦД та його серцево-судинних ускладнень важливу роль відіграють зміни обміну NO, але літературні дані щодо їх характеру та взаємозв'язку з порушеннями системи гемостазу є неоднозначними [9, 11, 12]. Актуальним залишається пошук антидіабетичних засобів, які б позитивно впливали на гемостаз, та визначення механізмів такого виду їх дії. В цьому напрямку досліджень перспективними є похідні бурштинової кислоти. Остаточо не з'ясовано особливості їх впливу на метаболізм NO та стан тромбоцитарно-коагуляційного гемостазу залежно від доз та тривалості експозиції.

Метою роботи було дослідити показники метаболізму NO та стану гемостазу, взаємозв'язок між їх змінами за умов введення шурам 2-ГФСА та β -ФЕСА у субтоксичних дозах.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 96 білих безпородних шурах-самцях масою 190-210 г. Дослідним шурам вводили 2-ГФСА та β -ФЕСА (перорально; 30-разово) у вигляді водної емульсії з Твін-80 у субтоксичних дозах 68 і 72 мг/кг відповідно. Їх дози розраховували як еквімолярні субтоксичній для β -ФЕА-ОСАК, яка становить 100 мг/кг. Контрольні тварини отримували водну емульсію Твін-80. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом на першу добу після завершення експериментів. Кожна дослідна та контрольна група нараховувала по 8 тварин. Показники гемостазу визначали у плазмі крові, метаболізму NO – у плазмі крові, сечі та гомогенаті печінки. Дослідження відповідали «Загальним етичним принципам експериментів на тваринах» (Україна, 2001).

Стан тромбоцитарної ланки гемостазу оцінювали визначенням часу агрегації тромбоцитів при змішуванні рівних об'ємів плазми крові та універсального індуктора агрегації згідно з інструкцією до набору фірми «Технологія-стандарт» (Росія). Процес коагуляції вивчали загальноприйнятими у гемостазіології методами визначення: активованого парціального тромбопластинового часу (АПТЧ), часу рекальцифікації, часткового тромбопластинового часу (ЧТЧ), протромбінового часу з розрахунком протромбінового відношення, тромбінового часу. Час рекальцифікації визначали мануально уніфікованим методом [13], інші показники – на коагулометрі Coag Chrom 3003 (Польща) наборами фірми «Технологія-стандарт» (Росія).

Стан метаболізму NO оцінювали за вмістом нітрит- (NO_2^-) та нітрат-аніонів (NO_3^-) у плазмі крові, сечі та 5%-му гомогенаті печінки спектрофотометричним методом за допомогою реакції Грісса [14]. Концентрацію NO_2^- і NO_3^- виражали у мікромолях на 1 л у плазмі та сечі, наномолях на 1 мг протеїну – у гомогенаті печінки. Активність NOS (КФ 1.14.13.19) визначали у 10%-му гомогенаті

печінки за швидкістю окиснення НАДФН у реакційній суміші: 2,5 мл 0,1 моль/л тріс-НСІ-буфера (рН 7,4), який містив СаСІ₂ – 10 ммоль/л; 0,3 мл водного розчину аргініну – 40 ммоль/л; 0,1 мл водного розчину НАДФН – 1 ммоль/л. До реакційної суміші додавали 0,1 мл гомогенату печінки [15]. Реакцію запускали внесенням у реакційне середовище 1 ммоль/л НАДФН, загальний об'єм проби був 3 мл. У контрольні проби замість розчину НАДФН додавали 0,1 мл бідистильованої води. Реєстрували зниження абсорбції дослідних проб, які вимірювали щодо контрольних на спектрофотометрі Shimadzu UV-1800 (Японія) при $\lambda=340$ нм (максимум поглинання НАДФН) протягом 5 хв при 37⁰ С. Активність NOS виражали у наномолях НАДФН за 1 хв на 1 мг протеїну. Вміст білка у гомогенаті печінки визначали методом Бредфорда [16].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета програм Anova. Нормальність розподілу в рядах визначали за критерієм Шапіро-Уїлка (W). Для парного порівняння груп досліду з контролем

використовували критерій t Стьюдента. Результати представлені як середнє арифметичне та його статистична похибка ($\bar{X} \pm S\bar{X}$). Кореляційний аналіз показників проведено методом Пірсона з обчисленням коефіцієнта парної кореляції (r). Вірогідними вважали результати при $P \leq 0,05$ та близькими до статистично значущих при $0,05 < P \leq 0,1$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оцінювання стану тромбоцитарної ланки гемостазу показало, що вплив β -ФЕСА у субтоксичній дозі характеризується тенденцією до скорочення часу агрегації тромбоцитів ($0,05 < P \leq 0,1$), тоді як 2-ГФСА не викликає змін показника у плазмі крові щурів (табл. 1). Згідно з раніше отриманими даними [17], β -ФЕСА здатний підвищувати агрегаційну активність тромбоцитів і за умов його застосування у дозі 18 мг/кг, яка еквімолярна ефективній для β -ФЕА-ОСАК (25 мг/кг), але ці зміни не виходять за межі фізіологічної норми для щурів на відміну від субтоксичної дози.

Враховуючи наведені результати, слід зазначити, що β -ФЕСА і 2-ГФСА не можуть

Таблиця 1. Показники стану тромбоцитарного та коагуляційного гемостазу у щурів за умов субхронічного введення в-фенілетилсукцинамідів (β -ФЕСА) і 2-гідроксифенілсукцинамідів (2-ГФСА) ($\bar{X} \pm S\bar{X}$, n=8)

Показник	Контроль 1	β -ФЕСА	Контроль 2	2-ГФСА
Час агрегації тромбоцитів, с	14,6 \pm 0,8	12,4 \pm 0,8** (85,0 \pm 2,6)***	20,0 \pm 0,7	20,8 \pm 1,7 (103,0 \pm 5,6)
Активованій парціальний тромбопластиновий час, с	55,0 \pm 4,6	50,8 \pm 2,3 (94,3 \pm 3,9)	43,4 \pm 1,6	40,0 \pm 2,6 (94,2 \pm 3,9)
Частковий тромбопластиновий час, с	126,0 \pm 6,4	102,9 \pm 4,0* (82,3 \pm 2,8)***	121,1 \pm 6,2	116,0 \pm 6,1 (96,1 \pm 2,7)
Час рекальцифікації, с	151,9 \pm 4,8	132,9 \pm 2,3* (89,0 \pm 0,5)	93,1 \pm 5,0	119,4 \pm 6,8* (128,2 \pm 1,7)***
Протромбіновий час, с	23,4 \pm 1,4	21,5 \pm 0,2 (91,9 \pm 1,0)	25,1 \pm 0,6	21,9 \pm 0,3* (87,1 \pm 1,2)***
Протромбінове відношення Тромбіновий час, с	1,43 \pm 0,09 16,5 \pm 2,3	1,32 \pm 0,01 11,0 \pm 0,8* (76,4 \pm 3,1)***	1,54 \pm 0,08 18,0 \pm 2,8	1,35 \pm 0,02* 15,1 \pm 1,9 (86,6 \pm 2,9)

Примітки: тут і в табл. 2 * $P \leq 0,05$ і ** $0,05 < P \leq 0,1$ порівняно з контролем; *** $P \leq 0,05$ і **** $0,05 < P \leq 0,1$ значущість відхилення значень при введенні β -ФЕСА і 2-ГФСА; у дужках – у відсотках до контролю.

впливати на антиагрегаційну активність їх вихідної сполуки відносно до тромбоцитів плазми крові, наявність якої у β -ФЕА-ОСАК було встановлено у попередніх експериментах [18].

Аналіз коагулограм шурів, які ізольовано отримували β -ФЕСА і 2-ГФСА у субтоксичних дозах, показав, що характер та ступінь змін показників, що визначають різні фази процесу коагуляції, дещо відрізняються між дослідженими сполуками (див. табл. 1).

За умов субхронічного введення β -ФЕСА відмічено вірогідне скорочення часу рекальцифікації плазми, яке вказує на прискорення процесу згортання крові у цілому. Зміни коагуляції стосуються фази I та більшою мірою III цього процесу, про що свідчить вірогідне зменшення ЧТЧ та тромбінового часу плазми крові (на 18 і 24% відповідно). Відомо, що ЧТЧ, як і АПТЧ залежить від активності плазмових факторів, які беруть участь у внутрішньому механізмі гемокоагуляції (факторів XII, XI, IX, VIII), але на відміну від АПТЧ цей показник чутливий до кількості тромбоцитів та активності тромбоцитарного фактора 3 (TF_3) – каталізатора протромбіноутворення [19]. Скорочення ЧТЧ при відсутності змін АПТЧ могло відбуватися у плазмі крові з підвищеною кількістю тромбоцитів. Скорочення тромбінового часу значною мірою визначається збільшенням вмісту фібриногену у плазмі крові. Аналогічні зміни цього показника зареєстровано у попередніх дослідженнях, в яких сполуку вводили щурам у дозі 18 мг/кг, але ці зрушення знаходились у межах фізіологічної норми. Наведені результати свідчать про те, що метаболіт β -ФЕА-ОСАК здатний підвищувати коагуляційний потенціал плазми крові за рахунок стимуляції судинного механізму формування протромбінази, а також збільшення швидкості фібриноутворення, щосуттєво пов'язано з активністю фібриногену.

На відміну від β -ФЕСА, вплив 2-ГФСА на стан коагуляційного гемостазу проявляється, навпаки, подовженням у 1,3 раза часу

рекальцифікації плазми ($P \leq 0,05$), що вказує на сповільнення згортання крові, переважно I фази процесу. Внаслідок дії цього метаболіту скорочується протромбіновий час і зменшується протромбінове відношення ($P \leq 0,05$), що збігається з напрямком змін цих показників на рівні дози 17 мг/кг [17] та віддзеркалює інтенсивність процесу утворення активної протромбінази зовнішнім (позасудинним) шляхом. Проте 2-ГФСА не впливає на інтенсивність кінцевої фази коагуляції, враховуючи відсутність змін тромбінового часу плазми крові (див. табл. 1).

Таким чином, досліджені сукцинамідні у субтоксичних дозах викликають різноспрямовані зміни часу рекальцифікації, які відображають в основному інтенсивність первинних реакцій коагуляційного каскаду. Однак дія β -ФЕСА на плазмовий гемостаз більшою мірою проявляється прискоренням згортання крові на етапі формування фібринових ниток, а 2-ГФСА – стимуляцією зовнішнього шляху коагуляції. Такі види активності метаболітів β -ФЕА-ОСАК, напевно, позначаються на дії їх вихідної сполуки щодо коагуляційного гемостазу в умовах її введення у субтоксичній дозі.

Гіперкоагуляційні зрушення, які відбувалися під впливом досліджених сукцинамідів (з ознаками активації агрегаційної функції тромбоцитів за умов введення β -ФЕСА), очевидно, можуть бути пов'язані зі змінами у системі NO–NOS. Для підтвердження цього припущення паралельно з дослідженням стану гемостазу визначали показники NO-обміну у шурів, які зазнали впливу β -ФЕСА та 2-ГФСА. Встановлено, що β -ФЕСА у субтоксичній дозі здатний гальмувати метаболізм NO, що характеризується зниженням у 1,5 раза активності NOS, на 19 і 18% вмісту NO_2^- і NO_3^- у печінці шурів (табл. 2). Вміст метаболітів NO у печінці знижується повільніше, ніж активність NOS, завдяки, очевидно, можливості їх часткового відновлення у нітрит-/нітрат-редуктазних реакціях замкненого циклу обміну NO або за рахунок інших компенсаторних механізмів, що збігається з

існуючими даними [20].

За дії 2-ГФСА і β -ФЕСА зареєстровано зниження вмісту NO_2^- і NO_3^- у плазмі крові та сечі, що більшою мірою проявляється під впливом першої сполуки (див. табл. 2). Ці зміни у разі β -ФЕСА певним чином зумовлені інгібуванням конститутивної NOS печінки, але обидва сукцинаміди, ймовірно, є інгібіторами NOS ендотелію судин та тромбоцитів, які можуть гальмувати утворення NO, а також високотоксичного пероксинітриду, який вважають проапоптотичним фактором. На вміст метаболітів NO у плазмі крові може позначатися здатність високореакційного NO вступати у взаємодію з тіол- та гемовмісними сполуками з утворенням більш стабільних транспортних форм та подальшим його депонуванням у тканинах [21].

Встановлено, що за впливу досліджених сукцинамідів суттєвіше знижується вміст NO_2^- , ніж NO_3^- у плазмі крові, а крім того обидва показники більше знижуються у сечі порівняно зі значеннями у плазмі крові (див. табл. 2). Відомо, що саме вміст NO_2^- у плазмі крові значною мірою залежить від ступеня активності ендотеліальної NOS (eNOS) та є

пропорційним загальному ендотеліальному синтезу NO, на відміну від інших його метаболітів. NO_2^- є реакційноспроможнішим, ніж NO_3^- , і тому залучений у широке коло метаболічних перетворень, що також позначається на більшому зниженні його вмісту [22]. На вміст NO_2^- і NO_3^- у позаклітинній рідині може впливати не тільки інтенсивність продукції NO, а і темпи ниркового кліренсу [23]. У наших дослідженнях гальмування темпів сечової екскреції NO_2^- і NO_3^- , ймовірно, пов'язано з посиленням їх канальцевої реабсорбції переважно у проксимальному сегменті нефрону, що запобігає суттєвій втраті організмом метаболітів NO. Такий вид активності, який пов'язаний із стимуляцією внутрішньониркових механізмів регуляції системи NO–NOS, є більш вираженим за дії 2-ГФСА порівняно з β -ФЕСА.

Таким чином, досліджені сукцинаміди у субтоксичних дозах викликають зниження вмісту метаболітів NO в організмі. На це можуть впливати, зокрема, активні форми кисню, які генеруються при підвищенні активності дихального ланцюга мітохондрій. Такі взаємопов'язані зміни встановлені за

Таблиця 2. Показники стану системи NO–NOS у щурів за умов субхронічного введення в-фенілетилсукцинамідів (β -ФЕСА) і 2-гідроксифенілсукцинамідів (2-ГФСА) ($\bar{X} \pm S\bar{x}$, n=8)

Показник	Контроль 1	β -ФЕСА	Контроль 2	2-ГФСА
Печінка				
NOS, нмоль/хв·мг протеїну	5,15 \pm 0,75	3,48 \pm 0,43** (66,8 \pm 7,5)****	3,73 \pm 0,34	3,09 \pm 0,37 (82,1 \pm 4,4)
NO_2^- , нмоль/мг протеїну	40,7 \pm 2,8	33,4 \pm 3,2** (81,2 \pm 2,9)	35,0 \pm 2,6	29,5 \pm 2,3 (84,5 \pm 2,3)
NO_3^- , нмоль/мг протеїну	60,1 \pm 4,1	50,0 \pm 4,6** (82,3 \pm 2,7)	51,8 \pm 3,7	40,0 \pm 6,5 (86,5 \pm 2,0)
Плазма крові				
NO_2^- , мкмоль/л	4,82 \pm 0,26	3,40 \pm 0,29* (70,4 \pm 2,6)	8,28 \pm 0,41	4,07 \pm 0,52* (50,8 \pm 4,9)***
NO_3^- , мкмоль/л	14,0 \pm 0,5	11,4 \pm 0,5* (80,9 \pm 1,2)	19,5 \pm 1,2	12,6 \pm 1,0* (65,5 \pm 3,7)***
Сеча				
NO_2^- , мкмоль/л	8,79 \pm 0,37	4,14 \pm 0,66* (50,3 \pm 5,0)	10,2 \pm 0,4	2,97 \pm 0,34* (28,7 \pm 2,3)***
NO_3^- , мкмоль/л	52,2 \pm 1,6	32,5 \pm 3,0* (62,3 \pm 4,0)	59,7 \pm 1,9	27,3 \pm 1,5* (45,5 \pm 1,2)***

дії β -ФЕА-ОСАК, який здатний стимулювати активність цитохром-с-оксидази мітохондрій, послаблювати активність NOS, сприяючи зменшенню вмісту метаболітів NO у плазмі крові, сечі та тканині печінки [24]. Недостатній синтез NO, у свою чергу, призводить до вільнорадикального ушкодження мембран клітин, що може бути одним із механізмів розвитку атеросклерозу.

Як відомо, основна роль NO пов'язана з вазодилатацією, гальмуванням агрегації тромбоцитів, їх адгезії і поліпшенням реологічних властивостей крові. Зниження концентрації NO, навпаки, може призводити до вазоконстрикції, посилення агрегації тромбоцитів та вільнорадикального окиснення [12]. У разі дії β -ФЕСА підвищення ступеня агрегації тромбоцитів, очевидно, певним чином залежить від пригнічення синтезу NO. Встановлено, що NO є активатором розчинної гуанілатциклази, яка каталізує синтез циклічного гуанозинмонофосфату. За умов низької концентрації NO знижується його вміст у тромбоцитах, що може призводити до посилення метаболізму арахідонової кислоти, утворення тромбоксанів A_2 і B_2 , накопичення кальцію у клітинах і активації тромбоцитів. Крім того, підвищується активність протеїнази С, яка фосфорилує низку білків масою 20-40 кДа, тим самим стимулюючи активність тромбоцитів та посилюючи їх агрегацію [11].

Зменшення вмісту NO_2^- і NO_3^- може супроводжуватися буферним накопиченням NO в S-нітрозотіолах та динітрозольних комплексах заліза з сірковмісними лігандами. Утворення таких комплексів попереджає токсичні ефекти пероксинітриду, який утворюється при взаємодії NO з супероксидним радикалом за умов підвищеного вмісту останнього [21].

Відомо, що NO регулює процес коагуляції, тому зниження його вмісту напевно сприяє підвищенню коагуляційного потенціалу плазми крові, ознаки якого виявлені при застосуванні досліджених сукцинамідів у субтоксичних дозах. Дослідженнями останніх років встановлена роль дефіциту оксиду

азоту та порушень коагуляційного ланцюга гемостазу у формуванні деяких форм патології, зокрема у механізмах розвитку церебральних порушень та ішемічного інсульту. Відзначали зниження продукції нітрит-аніонів одночасно зі скороченням часу згортання крові, часу рекальцифікації та ЧТЧ, що, в свою чергу, сприяло розвитку тромбозу [10].

Для системного відображення взаємозв'язків показників метаболізму NO та гемостазу, які змінювались в умовах субхронічного введення похідних бурштинової кислоти, проведено парний кореляційний аналіз. Для впливу β -ФЕСА характерна пряма кореляційна залежність між скороченнями часу рекальцифікації та ЧТЧ ($r=0,73$). Активність NOS має зворотний зв'язок із ступенем агрегації тромбоцитів ($r=-0,7$). Зниження вмісту NO_2^- , NO_3^- та активності NOS у печінці частково пов'язані з підвищенням коагуляційного потенціалу плазми крові у вигляді скорочення ЧТЧ ($r=0,65, 0,65, 0,66$). За дії β -ФЕСА коефіцієнт парної кореляції є прямим між вмістом NO_2^- і NO_3^- у плазмі крові та показниками гемостазу: часом агрегації тромбоцитів, часом рекальцифікації та тромбіновим часом ($r=0,66$ і $0,66; 0,66$ і $0,65; 0,67$ і $0,67$), між вмістом NO_2^- і NO_3^- у сечі та ЧТЧ плазми крові ($r=0,71$ і $0,7; 0,7$ і $0,7$). Вміст NO_2^- і NO_3^- печінки корелює з активністю процесів реабсорбції нирковими каналцями, що відображає значення цих показників у сечі ($r=-0,76$ і $-0,76; -0,75$ і $-0,75$).

За впливу 2-ГФСА встановлена пряма кореляційна залежність між зниженням вмісту NO_2^- і NO_3^- у плазмі крові та деякими показниками коагуляції: скороченням протромбінового часу ($r=0,72$ і $0,71$) та частково подовженням часу рекальцифікації ($r=0,67$ і $0,67$), які також корелюють між собою. У печінці дещо знижується активність NOS (майже на 20%), що однак добре корелює зі зменшенням вмісту NO_2^- і NO_3^- плазми крові ($r=0,77$ і $0,76$), а також відображається на скороченні протромбінового часу плазми крові ($r=0,71$). Встановлено пряму кореляційну залежність вмісту NO_2^- і NO_3^- у сечі

від значень цих показників у плазмі крові ($r=0,73$ і $0,73$; $0,74$ і $0,73$), а також частковий зв'язок посилення каналцевої реабсорбції у нирках з подовженням часу рекальцифікації плазми крові ($r=0,66$).

З огляду на одержані результати можна констатувати, що похідні бурштинової кислоти: β -ФЕСА і 2-ГФСА у субтоксичних дозах викликають зниження активності системи NO-NOS, що супроводжується змінами у системі гемостазу.

За умов субхронічного введення β -ФЕСА знижується активність NOS печінки, що певною мірою позначається на зменшенні вмісту NO_2^- і NO_3^- у печінці, а також у плазмі крові. Разом з цим зниження вмісту метаболітів NO у печінці відбувається повільніше, ніж активності NOS, зважаючи на можливість їх часткового відновлення нітрит-/нітратредуктазою або за рахунок активації інших компенсаторних механізмів. За впливу 2-ГФСА зниження вмісту NO_2^- і NO_3^- у плазмі крові є більш вираженим порівняно з односпрямованими ефектами β -ФЕСА та певним чином пов'язано з активністю NOS, що наразі знижується менш істотно. Отже, в умовах введення значених сукцинамідів зменшення вмісту метаболітів NO у печінці та плазмі крові залежить від активності NOS печінки. Проте на метаболізм NO, ймовірно, може впливати зниження активності NOS ендотелію судин та тромбоцитів, порушення антиоксидантного захисту та підвищення продукції вільних радикалів, що визначає актуальність подальших досліджень у цьому напрямку. Виявлене гальмування темпів сечової екскреції метаболітів NO, яке запобігає їх втраті організмом, є компенсаторною реакцією на зниження їх вмісту в організмі.

Встановлено, що за умов застосування похідних бурштинової кислоти у субтоксичних дозах підвищується коагуляційний потенціал плазми крові, за дії β -ФЕСА також посилюється агрегація тромбоцитів. Проте стимулювальна дія цих сполук на коагу-

ляційний гемостаз має деякі відмінності. β -ФЕСА активує внутрішньосудинний механізм утворення протромбінази та прискорює фібриноутворення, 2-ГФСА стимулює зовнішній шлях коагуляції. Такий напрямок змін гемостазу суттєво пов'язаний із зменшенням вмісту NO_2^- і NO_3^- у досліджених біосубстратах та активності NOS печінки, що підтверджують результати кореляційного аналізу цих показників.

Таким чином, під впливом β -ФЕСА та 2-ГФСА вміст NO_2^- і NO_3^- зменшується, у тому числі внаслідок зниження активності NOS, що відіграє певну роль при дії цих сукцинамідів на гемостаз у вигляді підвищення активності його коагуляційної та тромбоцитарної ланки.

И.А. Палагина, М.Я. Кудря, О.С. Лалыменко

РОЛЬ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СУБТОКСИЧЕСКИХ ДОЗ СУКЦИНАМИДОВ НА СОСТОЯНИЕ ГЕМОСТАЗА

Изучали роль изменений обмена эндогенного оксида азота (NO) при воздействии амидов янтарной кислоты – продуктов биотрансформации антидиабетического средства на состояние гемостаза. В эксперименте на крысах применяли синтезированные сукцинамиды в эквимольных количествах по отношению к субтоксической дозе фармацевтической субстанции. Определяли показатели, которые характеризуют состояние тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза в плазме крови, содержание стабильных метаболитов NO и активность синтазы оксида азота (NOS) в гомогенате печени, плазме крови и моче крыс. Установлено, что в условиях субхронического введения сукцинамидов уменьшается концентрация нитрит- и нитрат-анионов в плазме крови (на 30-50 и 20-35% соответственно), печени (на 16-19 и 14-18%) и моче (на 50-70 и 38-55%). Важным фактором этих изменений является снижение активности NOS (на 33%). Исследованные соединения в этих условиях повышают в 1,5 раза коагуляционный потенциал плазмы крови и могут усиливать на 20% агрегацию тромбоцитов. Анализ коэффициентов парной корреляции показал наличие связей измененных показателей метаболизма NO и гемостаза. Полученные результаты свидетельствуют о том, что проявление прокоагуляционного и тромбогенного действия сукцинамидов при их введении в субтоксических дозах в определенной степени обусловлено уменьшением вазоактивного пула

NO, что, в свою очередь, происходит за счет снижения активности NOS.

Ключевые слова: оксид азота; гемостаз; амиды янтарной кислоты.

I.A. Palagina, M.Y. Kudria, O.S. Lalymenko

ROLE OF NITRIC OXIDE METABOLITES WITHIN THE IMPACT OF THE SUB-TOXIC SUCCINAMIDES DOSES ON STATE OF HEMOSTASIS

We investigated the role of changes in the endogenous nitric oxide (NO) metabolism during the influence of succinic acid amides as biotransformation products of an anti-diabetic drug on the state of hemostasis. In experiment with rats, synthetic succinamides were applied in quantities equimolar to the sub-toxic dose of the pharmaceutical substance. We investigated the indicators characterizing the state of platelet and coagulation hemostasis in the blood plasma, the content of the stable NO metabolites and the activity of nitrogen oxide synthase (NOS) in the liver homogenate, blood plasma and urine of rats. We found that sub-chronic succinamides introduction reduced the nitrite and nitrate anions concentration in the blood plasma (by 30-50 and 20-35% resp.), liver (by 16-19 and 14-18%) and urine (by 50-70 and 38-55%). These changes were essentially dependent on the reduction in the NOS activity (by 33%). The studied compounds showed a 1.5 fold increase in the coagulation potential of the blood plasma and cause a 20% boost in the aggregation of thrombocytes. Analysis of the pair correlation coefficients showed positive association of the changes in indicators of the NO metabolism and hemostasis. The obtained results suggest that the registered manifestation of the pro-coagulation and thrombogenic action of succinamides applied in the sub-toxic doses is partially determined by a drop of the vasoactive NO pool that in turn, occurs due to a decline of the NOS activity.

Key words: nitric oxide; hemostasis; amides of succinic acid.

V.Y. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems, AMS of Ukraine, Kharkiv.

REFERENCES

1. Targher G, Chonchol M, Zoppini G, Franchini M. Hemostasis disorders in type 1 diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost.* 2011;37(1):58-65.
2. Syropyatov BYa, Kolotova NV, Dolzhenko AV. Effect of derivatives of succinic and maleic acids on blood coagulation. *Probl Biol, Med & Pharmaceut Chem.* 2012;(5):31-6. [Russian].
3. Ercan M, Firtina S, Konukoglu D. Comparison of plasma viscosity as a marker of endothelial dysfunction with nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in subjects with dyslipidemia. *Clin Hemorheol Microcirc*

- 2014;57(4):315-23.
4. Gorbenko NI. Pathogenic basis of succinic acid derivative - phensuccinal efficacy in therapy of diabetes mellitus and its complications (experimental study) [dissertation]. Kharkiv: V. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems at AMS of Ukraine; 2004. [Ukrainian].
5. Palagina IA, Kudria MY, Ustenko NV. Assessment criteria of safety and risk of drugs with anti-diabetic and estrogenoid activeness [abstract]. *Toxicology Letters.* 2008;180 Suppl 1:S241.
6. Mayer B, ed. Nitric oxide. New York: Springer Science & Business Media; 2012.
7. Wu G, Meininger CJ. Nitric oxide and vascular insulin resistance. *Biofactors.* 2009;35:21-7.
8. Li H, Horke S, Forstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2014 Nov;237(1):208-19.
9. Bloomgarden ZT. Cardiovascular diseases in diabetes. *Diabetes Care.* 2010;33:49-54.
10. Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and chemical implications. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders.* 2011;11:61-74.
11. Kim JH, Bae HY, Kim SY. Clinical marker of platelet hyperreactivity in diabetes mellitus. *Diabetes Metab J.* 2013;37(6):423-28.
12. Kravets EB. Diabetology: scale of problem, achievements and perspective directions. *Bull of Siberian Medicine.* 2005;(1):9-18. [Russian].
13. Menshikov VV, editor. Laboratory methods of study in the clinics. Laboratory manual. Moscow: Medicine; 1987; p. 378. [Russian].
14. Solodkov AP, Veremey IS, Osotchuk SS, Sherbinin IU, Dedun GV, Dubrovskaya AV. Photometric method of defining nitrites and nitrates in biological liquids (Manual): appr. by Ministry of Health Care of Belarus Rep. 19.03.01. Vitebsk: [w/o publ.]; 2001; p. 9. [Russian].
15. Sumbaev VV, Yasinskaya IM. DDT effect on rat liver, lungs and brain nitric oxide synthase activity. *Modern Probl Toxicol* 2000;(3):3-7. [Russian].
16. Gasparov VS, Gegtyar VG. Definition of protein by its linkage to Kumassi Diamond light-blue G-250 dye. *Biochem.* 1994;59(6):763-75. [Russian].
17. Palagina IA, Kudrya MYa. State of thrombocyte-coagulation hemostasis in rats under influence of metabolites of succinic acid derivatives. *Probl Endocrine Pathology* 2013;(3):82-7. [Russian].
18. Palagina IA, Lalymenko OS, Kudria MY. Influence of succinate-carrying compounds on the NO-synthase activeness and thrombocyte-coagulation hemostasis [abstract]. *Ukr Biochem J.* 2014;86(5 Suppl 2):S120. [Ukrainian].
19. Laposata M, editor. Coagulation disorders: Diagnostic standards of care. New York: Demos Medical Publ.; 2010. 136 p.
20. Jansson EA, Huang L, Malkey RA Mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric

- oxide homeostasis. Nat Chem Biol. 2008; 4(7):411-7.
21. Shumaev KB, Kosmachevskaya OV, Timoshin AA. Dinitrosyl iron complexes bind with hemoglobin as markers of oxidative stress. Methods Enzymol. 2008; 436: 445-61.
22. Toledo JC Jr, Augusto O. Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. Chem Res Toxicol. 2012; 25(5):975-89.
23. Horita S, Nakamura M, Shirai A, Yamazaki O, Satoh N, Suzuki M, et al. Regulatory roles of nitric oxide and angiotensin II on renal tubular transport. J World Nephrol. 2014;3(4):295-301.
24. Kudria MY, Palagina IA, Mishenko TV, Ustenko NV, Pavlenko TA, Zhurakovskaya MV. Influence of phensuccinal and its metabolites on carbohydrate and energy metabolism at rats in the conditions of subchronic experiments. Probl Endocrine Pathology. 2012;(4):109-15. [Russian].

*Матеріал надійшов до
редакції 01.04.2016.*