УДК 613.6: 613.63;615.9; 615.252.349.7

ВИЗНАЧЕННЯ БІОМАРКЕРІВ ЕКСПОЗИЦІЇ ПОХІДНОГО ЯНТАРНОЇ КИСЛОТИ З АНТИДІАБЕТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ

Лалименко О.С., Завгородній І.В.

Харківський національний медичний університет, м. Харків, Україна

Анотація. *Статтю присвячено обґрунтуванню критеріїв для проведення біологічного моніторингу людини – біомаркерів експозиції, шляхом виявлення нових моделей причинно-наслідкових взаємозв'язків між рівнем екзогенної дози антидіабетичного засобу похідного янтарної кислоти та кількісним вмістом цієї сполуки та її метаболітів у бологічному субстраті і визначенням їх в якості патогномонічних критеріїв субхронічного впливу антидіабетичного засобу незалежно від шляхів надходження до організму*

Ключові слова: *біомаркер експозиції, біологічний моніторинг, похідне янтарної кислоти*

Вступ. На сьогодні залишається актуальною проблема оцінки ризику хімічного впливу на стан здоров'я персоналу підприємств та населення, які піддаються підвищеному техногенному навантаженню, з метою розробки профілактичних заходів щодо попередження їх негативного впливу [1].

Гігієнічна ідентифікація небезпечних хімічних факторів та критеріальна оцінка їх ефектів за умов хронічної дії є важливою складовою системи доказів причинно-наслідкових зв'язків між дією хімічних факторів виробничого середовища на здоров'я працюючих/ населення та формуванням небажаних відхилень у стані здоров'я. Даний аспект, в свою чергу, дозволяє проводити більш поглиблене оцінювання реальної небезпеки впливу ксенобіотиків на організм персоналу підприємств або населення [2-3].

Оцінка експозиції (міри зовнішньої дії) хімічного чинника є складовою кількісної оцінки ризику дії ксенобіотиків на здоров'я працюючих або населення. Узагальнюючими способами оцінювання експозиції небезпечного хімічного фактора – є характеристика виробничого середовища з встановленням основних джерел забруднення, маршрутів розповсюдження ксенобіотика з урахуванням діючої концентрації (дози), частоти і тривалості впливу на організм та вмісту речовини (метаболітів) в біологічних субстратах людини або рівнем біологічного ефекту, викликаного дією шкідливої речовини. Встановлення безпечних рівнів вмісту хімічних сполук в різних біологічних середовищах у працюючих/експонованого населення, як на етапі їх синтезу, так і подальшого промислового використання є виправданими та перспективними етапами гігієнічного регламентування ксенобіотиків у різних середовищах та є одним із пріоритетних підходів біологічного моніторингу людини [4].

Біологічний моніторинг може бути визначений як метод оцінки експозиції (дії, впливу) небезпечних хімічних сполук на здоров'я людини шляхом вимірювання вмісту цих речовин або продуктів їх біотрансформації в пробах біологічного матеріалу людини [5]. Біомаркер експозиції – це вміст/концентрація токсиканта або його метаболітів в біологічному субстраті (плазма і сироватка крові, сеча, слина, волосся тощо), що залежить від рівня екзогенної дози речовини, яка потрапила до організму людини. Застосування цього підходу в сфері медицини праці передбачає регулярний контроль величин біомаркерів експозиції на окремих особах та групах працюючих, сформованих з урахуванням професії, стажу, виробничого процесу та інших конкретних умов [6].

Підприємства хіміко-фармацевтичної промисловості є джерелами менш багатотонажних, але значно більш різноманітних за токсичними викидами у виробниче та навколишнє середовище. Провідним несприятливим чинником, зокрема при виробництві лікарських засобів, є забруднення шкідливими органічними та неорганічними речовинами повітря робочих приміщень, одягу, шкірних покривів працівників, поверхонь устаткування, будівельних конструкцій, території промислових майданчиків та довкілля [7-8].

Найважливішою умовою ефективності оцінювання ризиків впливу хімічних речовин є одночасне використання методів контролю якості повітря робочої зони (атмосферного повітря), тобто проведення хімічного моніторингу та біологічного моніторингу як інструментів доказової медицини професійних інтоксикацій для підвищення надійності захисту здоров'я працюючих. Тому, встановлення залежності між вмістом хімічної сполуки, зокрема, лікарського засобу в повітрі виробничих приміщень та рівнем самої сполуки (або її метаболітів) в біологічних субстратах працюючих залишається вельми актуальним [9-10].

Обраний для дослідження оригінальний антидіабетичний засіб β-фенілетиламід 2 - оксисукцинанілової кислоти – похідне янтарної кислоти (АДЗ-ПЯК), який синтезовано в ДУ «Інститут проблем ендокринної патології імені В. Я. Данилевського НАМН України» (м. Харків), має широкий спектр фармакологічної активності [11]. Потенційними метаболітами антидіабетичного засобу є 2-гідроксифенілсукцинамід (2-ГФСА) та β–фенілетилсукцинамід (β-ФЕСА).

Мета дослідження полягала в обґрунтуванні біомаркерів експозиції на прикладі похідного янтарної кислоти з антидіабетичною активністю за умов субхронічного токсикологічного експерименту.

Матеріали та методи досліджень. Експерименти виконано на нелінійних щурах-самцях. Репрезентативну вибірку формували методом випадкового відбору тварин з генеральної сукупності, їх розподіл на експериментальні групи – методом рандомізації. Усі експериментальні дослідження проведені відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах». Проведено субхронічне внутрішньошлункове (30 - денне в дозі 100 мг/кг м. т.) та інгаляційне (20 – денне) надходження АДЗ-ПЯК на рівні порогу гострої (Lim_{ac}) – 27,9 мг/м^3 та хронічної інгаляційної дії (Lim_{ch}) –2,63 мг/м^3.

Визначення біомаркерів експозиції, а саме, концентрації похідного янтарної кислоти з антидіабетичною активністю (АДЗ-ПЯК) та його метаболітів здійснено шляхом хроматографічного вимірювання концентрацій сполук у плазмі крові в термін 5, 15, 20, 30 днів на підставі розробленої біоаналітичної методики методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Хроматографічний аналіз біозразків проводили на рідинному хроматографі Agilent 1260 зі спектрофотометричним детектором (Agilent Technologies, США), автосамплером, колонкою сталевою розміром 250 × 4,0 мм Nucleosil 100-5 C18 та термостатом колонок. Обробку даних проводили за допомогою програмного забезпечення ChemStation (ver. B.04.03) (Agilent Technologies, США).

Фактичний матеріал обробляли методами варіаційної статистики із застосуванням пакету програмного забезпечення StatSoft 10 [220]. Для обґрунтування біомаркерів експозиції проведено математичне моделювання залежності «екзогенна доза антидіабетичного засобу − концентрація антидіабетичного засобу/його метаболітів в плазмі крові».

Результати та їх обговорення.

Дослідження проведені на біозразках плазми крові щурів-самців, що внутрішньошлунково та інгаляційно отримували субстанцію антидіабетичного засобу. Біосубстрат інтактних тварин використовували для приготування калібрувальних розчинів. Зразки плазми крові тварин піддавались пробопідготовці: термоденатурації аліквот плазми крові, ферментативній декон'югації та етапу осадження протеїнів плазми крові розчином ацетонітрилу у кислому середовищі з наступним хроматографуванням проб, їх ідентифікацією та кількісним визначенням досліджуваних сполук. Отримано високий рівень повноти вилучення досліджуваних сполук з плазми крові, враховуючи їх одночасну присутність в біологічному субстраті. Кількісне хромаграфічне визначення досліджуваних сполук проведено на підставі валідаційно оціненої, селективної біоаналітичної методики кількісного визначення АДЗ-ПЯК та метаболітів у плазмі крові із внутрішньосерійною прецизійністю для концентрації антидіабетичного засобу – 6 %, для 2-ГФСА−10 %, для β-ФЕСА −5 %.

На підставі аналізу даних хроматографічного визначення концентрації досліджуваних сполук у плазмі крові за умов внутрішньошлункового та інгаляційного надходження в залежності від рівнів екзогенного впливу субстанції антидіабетичного засобу було проведено формування бази даних в яких зіставлено: рівень екзогенної дози сполуки (розрахунок об’єму та дози введення здійснено на кожну тварину та розраховано на кг маси тіла) із концентрацією АДЗ-ПЯК та його метаболітів в плазмі крові.

На підставі відповідних даних побудовано адекватні логістичні моделі, виявлені та оцінені параметри залежності «екзогенна доза антидіабетичного засобу – концентрація АДЗ-ПЯК/метаболітів у плазмі крові».

Для встановлення біомаркера експозиції виявляли кореляційний зв'язок між зовнішньою експозицією і концентрацією речовини у біологічному субстраті, у нашому випадку плазмі крові. Для перевірки статистичних гіпотез щодо коефіцієнтів регресії у разі нормального розподілу показників використовується критерій Стьюдента. Перевірку адекватності здійснювали за допомогою дисперсійного аналізу з використанням критерію Фішера та рівнем статистичної значущості 0,05. При встановленні адекватної моделі, що відбиває досліджувану залежність, концентрацію хімічної речовини в плазмі крові приймали в якості біомаркера експозиції субхронічного впливу.

На підставі вищеозначеного отримано математичну модель, що описує дані залежності і представляє собою рівняння лінійної регресії виду: а) $y = 5{,}9153 \cdot x - 109{,}4$, де y–концентрація АДЗ-ПЯК в плазмі крові нг/мкл; x– екзогена кількість субстанції АДЗ-ПЯК, мг; б) $y_1 = 5{,}6587 \cdot x - 109{,}62$, де y_1 – концентрація 2-ГФСА в плазмі крові нг/мкл; в) $y_2 = 10{,}808 \cdot x - 225{,}59$, де y_2 – концентрація β-ФЕСА в плазмі крові нг/мкл.

Рівняння лінійної регресії, що отримані при аналізі даних за умов інгаляційного впливу сполуки мають наступний вигляд: а) $Y = 0{,}03 \cdot x + 9{,}2$, де Y – концентрація АДЗ-ПЯК в плазмі крові нг/мкл, x–екзогенна кількість субстанції АДЗ-ПЯК, мкг; б) $Y^1 = 0{,}007 \cdot x + 3{,}7$, де Y^1 – концентрація 2-ГФСА в плазмі крові нг/мкл; в) $Y^2 = 0{,}04 \cdot x + 2{,}8$, де Y^2 – концентрація β-ФЕСА в плазмі крові нг/мкл.

Графіки залежностей між внутрішньошлунковою, інгаляційною дозою субстанції АДЗ-ПЯК та концентрацією вихідної речовини в плазмі крові представлено на рис. 1-2.

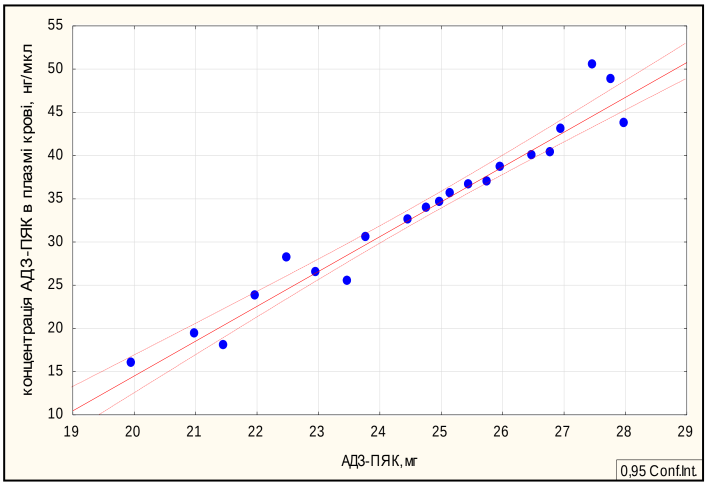

Рис. 1 Залежність між внутрішньошлунковою дозою субстанції АДЗ-ПЯК та його концентрацією в плазмі крові (r=0,87, F= 14,2, p≤ 0,0000)

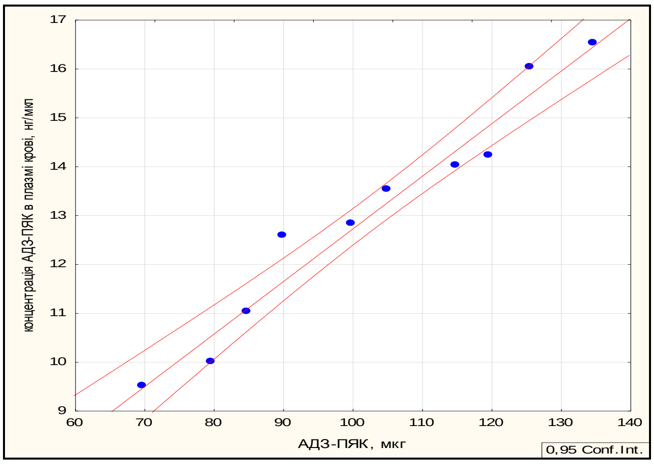

Рис. 2 Залежність між рівнем інгаляційного впливу субстанції АДЗ-ПЯК та його концентрацією в плазмі крові (r=0,89; F= 20,5; p≤ 0,0002)

Аналогічні графіки залежностей отримано при визначенні концентрацій метаболітів 2-ГФСА та β-ФЕСА в плазмі крові.

Виявлено, що після п'яти днів внутрішньошлункового надходження середня концентрація метаболіту β-ФЕСА становила 41,7±7,9 нг/мкл, що перевищувало вміст вихідної сполуки (37,1±3,6 нг/мкл) та метаболіту 2-ГФСА (30,3±4,6 нг/мкл). Проте, при подовженні терміну спостереження до 15 днів відбувалось зниження концентрацій досліджуваних сполук в плазмі крові, що, можливо, пов'язано з прискоренням процесів біотрансформації у печінці та утворенням більш полярних та реакційноспроможних речовин, які швидко елімінуються із організму. Поряд з цим середні значення біомаркерів експозиції антидіабетичного засобу та його метаболіту β-ФЕСА після 5 та 30 днів знаходились практично на одному рівні.

При інгаляційній дії субстанції АДЗ-ПЯК на рівні Lim_{ac} концентрація β-ФЕСА в плазмі крові становила 41,6±2,1 нг/мкл, що суттєво перевищувало рівні вихідної сполуки 28,7±4,5 нг/мкл та метаболіту 2-ГФСА- 9,2±1,0 нг/мкл. На відміну від цього при інгаляційній дії субстанції АДЗ-ПЯК на рівні порогу хронічної інгаляційної дії Lim_{ch}, у плазмі крові рівні АДЗ-ПЯК становили 15,8±2,5 нг/мкл, що значно перевищувало концентрації його метаболітів, які розподілені з незначним переважанням у бік β-ФЕСА– 4,5±0,7 нг/мкл проти 2,9±0,6 нг/мкл у 2-ГФСА.

Таким чином, в умовах субхронічного внутрішньошлункового та інгаляційного надходження субстанції АДЗ-ПЯК досліджувані сполуки ідентифікувалися у плазмі крові щурів протягом всього експерименту.

Висновки та перспективи. На підставі виявлених статистично значущих кореляційних зв'язків між екзогенним рівнем впливу антидіабетичного засобу і концентраціями АДЗ-ПЯК, метаболітів 2-ГФСА і β-ФЕСА в плазмі крові (коефіцієнти кореляції r=0,81; 0,74; 0,85 при внутрішньошлунковій дії та r=0,89; 0,7; 0,80 при інгаляційному надходженні) можна вважати ці сполуки біомаркерами експозиції субхронічного впливу похідного янтарної кислоти з антидіабетичною властивістю.

Зазначене направлення, а саме, застосування підходів біологічного моніторингу людини відкриває перспективи проведення більш ретельного, індивідуалізованого контролю впливу хімічних сполук, зокрема лікарських засобів, на працюючих в умовах відповідних промислових підприємств та створює передумови для поглибленого гігієнічного нормування хімічних чинників.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ ЭКСПОЗИЦИИ ПРОИЗВОДНОГО ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ С АНТИДИАБЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Лалыменко О.С., Завгородний И.В.

Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина

Аннотация. *Статья посвящена обоснованию критериев для проведения биологического мониторинга человека – биомаркеров экспозиции, путем выявления новых моделей причинно-следственных взаимосвязей между уровнем экзогенной дозы антидиабетического средства производного янтарной кислоты и количественным содержанием этого соединения и его метаболитов в бологичном субстрате с определением их в качестве патогномоничных критериев субхронического влияния антидиабетического средства независимо от путей поступления в организм.*

Ключевые слова: *биомаркер экспозиции, биологический мониторинг, производное янтарной кислоты.*

DETERMINATION BIOMARKERS OF EXPOSURE OF SUCCINIC ACID DERIVATIVES WITH ANTIDIADETIC ACTIVITY

Lalymenko O. S., Zavgorodnii I.V.

Annotation. *The article is devoted to the substantiation of criteria for conducting human biological monitoring - exposure biomarkers, by revealing new models of causal relationships between the level of exogenous dose of an anti-diabetic agent - succinic acid derivative and the quantitative content of this compound and its metabolites in the biological substrate, identifying them as pathognomonic criteria of subchronic impact of anti-diabetic agent regardless of the routes of its entry into the body.*

Key words*: biomarkers of exposure, human biomonitoring, succinic acid derivatives*

Список літератури

1. Білецька Е, Онул Н, Головкова Т, Антонова О, Землякова Т. Еколого-гігієнічна детермінованість погіршення здоровя населення промислового регіону. Довкілля та здоровя. 2016; 4:15–8.

2. Stahlmann R˙, Horvath A. Risks, risk assessment and risk competence in toxicology. Ger Med Sci. 2015; 9:13.

3. WHO. Principles for evaluating health risks in children associated with exposure to chemicals (Environmental Health Criteria 237) [Internet]. Geneva: WHO; 2006 [cited 2014 March 19]. Available at: http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc237.pdf

4. Директива Комісії 2017/164/ЄС. Про встановлення третього списку індикативних значень меж професійної експозиції (впливу). [Internet]. Brussels: European commission; 2017 [cited 2011 March 1]. Available from: https://osha.europa.eu/en/legislation/directive/directive-2017164eu-indicative-occupational-exposure-limit-values

5. Lowry L.K. How to promote the use of biological monitoring. Toxicol. Lett. 2014;231(2):289–90.

6. Persoons R, Richard J, Herve C, Montlevier S, Marques M, Maitre A. Biomonitoring of styrene occupational exposures: Biomarkers and determinants. Toxicol Lett. [Internet]. 2018 [cited 2016 Feb 12]; 291: S1066–9. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov.

7. Арустамян О, Ткачишин В, Кондратюк В, Корж А, Алексейчук О. Сучасні проблеми професійної патології в Україні. Довкілля та здоровя. 2017; 4:62–7.

8. Вовк О, Бойченко М. Причинно-наслідковий аналіз стану екологічної безпеки під час виробництва та використання фармацевтичної продукції. Наукоємні технології . 2017;1(33):1-7.

9. Committee on Human Biomonitoring for Environmental Toxicants. Human Biomonitoring for Environmental Chemicals. [Internet]. Washington: National Academies Press. NRC; 2006. Available from: https://www.nap.edu/catalog/11700/human biomonitoring for environmental chemicals

10. Pralong L, Berthet A, Vernez D, Hopf N, Benaroyo L. Biomonitoring information management and communication: an ethical and interdisciplinary perspective. Rev Med Suisse. 2015;11(499):2400-3.

11. Горбенко Н. Патогенетичне обґрунтування ефективності похідного янтарної кислоти – фенсукциналу в терапії цукрового діабету та його судинних ускладнень (експериментальне дослідження) [автореферат]. Харків: Інститут проблем ендокринной патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України. 2004. 36 с.

References

1. Biletska E, Onul N, Golovkova T, Antonova O, Zemlyakova T. (2016), Ecological-hygienic determination of deterioration of health of the population of the industrial region, Environment and health, N 4, 15–18.

2. Stahlmann R., Horvath A. (2015), Risks, risk assessment and risk competence in toxicology, Ger Med Sci. N 9, 10-13.

3. WHO. Principles for evaluating health risks in children associated with exposure to chemicals (Environmental Health Criteria 237) [Internet]. Geneva: WHO; 2006 [cited 2014 March 19]. Available at: http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc237.pdf

4. Commission Directive 2017/164 / EC. On establishing a third list of indicative occupational exposure limits. [Internet]. Brussels: European Commission; 2017 [cited 2011 March 1]. Available from: https://osha.europa.eu/en/legislation/directive/directive-2017164eu-indicative-occupational-exposure-limit-values

5. Lowry L.K. (2014), How to promote the use of biological monitoring. Toxicol. Lett. 231(2):289–290.

6. Persoons R, Richard J, Herve C, Montlevier S, Marques M, Maitre A. Biomonitoring of styrene occupational exposures: Biomarkers and determinants. Toxicol Lett. [Internet]. 2018 [cited 2016 Feb 12]; 291: S1066–9. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov.

7. Arustamyan O, Tkachishin V, Kondratyuk V, Korzh A, Alekseychuk O. (2017), Modern problems of occupational pathology in Ukraine, Environment and health, N 4 , 62–67.

8. Vovk O, Boychenko M. (2017), Cause and effect analysis of environmental safety during the production and use of pharmaceutical products, Technology-intensive N 1 (33), 1-7.

9. Committee on Human Biomonitoring for Environmental Toxicants. Human Biomonitoring for Environmental Chemicals. [Internet]. Washington: National Academies Press. NRC; 2006. Available from: https://www.nap.edu/catalog/11700/human biomonitoring for environmental chemicals

10. Pralong L, Berthet A, Vernez D, Hopf N, Benaroyo L. (2015), Biomonitoring information management and communication: an ethical and interdisciplinary perspective, Rev Med Suisse. N 11(499), 2400-2403.

11. Gorbenko NO. (2004) Pathogenetic substantiation of the effectiveness of succinic acid - fensuccinal derivative in the treatment of diabetes mellitus and its vascular complications (experimental study) Kharkov Institute of Problems of Endocrine Pathology Danilevsky, National Academy of Medical Sciences of Ukraine.

Інформація про авторів:

Лалименко Ольга Сергіївна к.мед.н., Харківський національний медичний університет, асистент кафедри гігієни та екології № 2, г. Харьков, пр. Науки, 4, 61022, ORCID ID 0000-0002-9279-1377. тел. моб. 0661595653, e-mail: yaloposta@gmail.com

Завгородній Ігор Володимирович, д.мед.н., проф., Харківський національний медичний університет, завідувач кафедри гігієни та екології № 2, г. Харьков, пр. Науки, 4, 61022, ORCID ID 0000-0001-7803-3505; тел. моб. +380 (50) 343 31 87; e-mail: zavnikua@gmail.com