

Н.П. Дмитренко, профессор<sup>1</sup>, В.М. Михайленко, к.б.н.<sup>2</sup>,  
А.А. Главин, к.б.н.<sup>2</sup>, С.В. Сноз, к.б.н.<sup>1</sup>, Т.О. Кишко, к.б.н.<sup>1</sup>,  
С.Г. Шандренко<sup>1</sup>, Л.Н. Смердова, к.б.н.<sup>1</sup>

## ОБМЕН N-НИТРОЗО- ДИМЕТИЛАМИНА У КРЫС СО СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫМ ДИАБЕТОМ

<sup>1</sup> Институт экогигиены и токсикологии им. Л.И. Медведя МЗ  
Украины, Киев

<sup>2</sup> Институт экспериментальной патологии, онкологии и  
радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАНУ, Киев

*Изучено биотрансформацию N-нитрозодиметиламина (НДМА) и его синтез из амидопирина при ингаляции оксида азота и введении 4-метилпиразола в качестве ингибитора цитохрома P-450 при стрептозотоциновом диабете у крыс.*

*Через 2 недели после интраперитонеальной инъекции стрептозотцина в дозе 55 мг/кг взрослым крысам-самцам линии Wistar у них относительно контрольных животных увеличились уровень глюкозы и активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови, а также количество выделяемой с мочой аскорбиновой кислоты, эритроцитарное содержание 2,3-дифосфолицерата.*

*Показано, что в условиях стрептозотоцинового диабета уменьшилась экскреция с мочой нитрат-аниона, образующегося в организме из NO эндогенного и экзогенного происхождения, а также снизилась скорость деметилирования НДМА в печени и его эндогенное образование из предшественников. Последнее, возможно, связано с менее благоприятными для N-нитрозирования условиями (рН, концентрация и соотношение предшественников, наличие ингибиторов) в желудке, тканях и жидкостях организма диабетических крыс.*

*Отсутствие значительного накопления НДМА у контрольных крыс даже в условиях, благоприятных для его образования в организме, может указывать на то, что применительно к этому N-нитрозамину, как, возможно, и ко многим другим, скорость биотрансформации существенно преобладает над синтезом, определят*

*токсические эффект и служит основным биомаркером опасности влияния на организм. Полученные данные позволяют предположить меньшую опасность воздействия на организм НДМА при диабете.*

Нарушение обмена оксида азота (NO) рассматривается как одна из причин возникновения сахарного диабета 1-типа. Оно может быть вызвано неблагоприятной экологической обстановкой, способствующей поступлению в организм NO, нитритов, нитратов и N-нитрозосоединений, преимущественно в виде N-нитрозаминов (НА) [1-3], а также эндогенными условиями, при которых усиливается образование NO [4]. Последнее имеет выраженную избирательность в отношении  $\beta$ -клеток поджелудочной железы и реализуется через реактивные формы оксида азота непосредственно или же путем инициации аутоиммунного процесса [5-7]. Нельзя исключить и самостоятельное цитотоксическое действие нитрит- и нитрат-анионов [8]. N-нитроамины оказывают в организме канцерогенное, мутагенное и цитотоксическое действие, которое обусловлено продуктами их биотрансформации цитохромом P-450, в частности, изоформой 2E1 [9-11]. Предполагается, что индуцируемое стрептозотоцином у животных избирательное повреждение панкреатических  $\beta$ -клеток связано с тем, что из стрептозотцина, как N-нитрозосоединения, в процессе биотрансформации высвобождается оксид азота [12]. Серьезные нарушения обмена, возникаю-

щие при сахарном диабете, распространяются и на систему биотрансформации ксенобиотиков. Так, при стрептозотоциновом диабете у крыс отмечают существенные изменения в содержании изоформ цитохрома P-450, его спонтанной и индуцируемой широким спектром ксенобиотиков активности, в частности, увеличение экспрессии изоформы P-450 2E1 (CYP2E1), ответственной за биотрансформацию N-нитроаминов [13-16]. Однако в отношении направленности этих изменений полученные результаты зачастую противоречивы. Это отчасти может быть связано с тем, что функция цитохрома P-450 и его регуляторные механизмы имеют выраженную тканевую и видовую специфичность [17 — 19].

Около 1% людей страдают сахарным диабетом [20] и, следовательно, составляют значительную категорию населения с измененной реакцией на химическую нагрузку, в формировании которой участвуют и различные N-нитроамины, что требуется учитывать при разработке нормативов, оценивающих опасность воздействия химических факторов на организм. Нами не обнаружено данных в отношении особенностей биотрансформации и синтеза из содержащих азот предшественников N-нитрозодиметиламина (НДМА) при диабете, хотя высокая активность метаболизма этого канцерогенного соединения в организме и относительная легкость его образования в различных объектах окружающей среды довольно хорошо изучены.

В связи с изложенным, нами проведены исследования по изучению особенностей синтеза из амидопирина и биотрансформации НДМА у крыс со стрептозотоциновым диабетом в условиях ингаляции оксида азота и ингибирования цитохрома P-450 4-метилпиразолом.

### Материалы и методы

Опыты проводили на крысах линии Wistar, масса 140-200 г, содержащихся на стандартном рационе виария.

Диабет у животных вызывали путем одноразового внутривентрального введения раствора стрептозотцина (СТЦ) (фирма "Sigma", США) в 1 М питательном буфере pH 4,5 в дозе 55 мг/кг массы тела. Крыс после

инъекции стрептозотоцина брали в эксперимент через 2 недели. Воздействие NO на крыс осуществляли в ингаляционной камере в течение 4-х часов. Концентрация NO в камере поддерживалась на уровне  $100 \text{ мг/м}^3$  путем дозированной подачи с током воздуха 1% NO в смеси с азотом. Непосредственно перед началом ингаляции NO крысам внутривенно вводили предшественник НДМА амидопирин (АП) в дозе  $250 \text{ мг/кг}$  массы тела. Ингибитор катаболизма НДМА 4-метилпирозол (МП) вводили внутривенно в дозе  $75 \text{ мг/кг}$  массы тела за 15 мин до и через 7 ч после введения АП. Животные были разделены на 8 групп по 7-9 крыс в каждой: 1 — интактный контроль; 2 — диабет; 3 — NO; 4 — диабет + NO; 5 — АП + NO; 6 — диабет + АП + NO; 7 — МП + АП + NO; 8 — диабет + МП + АП + NO.

После окончания ингаляции NO крыс для сбора суточной мочи помещали в снабженные мочеиспускательными камерами, наличие в которых

2 мл 5 н NaOH предотвращало синтез НА, и затем умерщвляли путем декапитации под эфирным наркозом с целью получения образцов тканей. В печени определяли фоновое, спонтанное, ферментативное и аскорбатзависимое перекисное окисление липидов (ПОЛ) по содержанию МДА [21], N-деметилирующую и денитрозирующую активности цитохрома P-450 [22]. Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови осуществляли с помощью стандартного набора (АО "Реагент", г. Днепропетровск).

В сыворотке крови и моче определяли содержание нитритов методом Грисса [23], нитратов, восстанавливая их до нитритов с помощью кадмиевой колонки [24]. Сыворотку крови предварительно депротеинизировали с помощью трихлоруксусной кислоты (конечная концентрация 5%), и доводили pH до 7,5- 8,0 аммиачным буфером, используемым при восстановлении нитратов в кадмиевой колонке. Мочу перед определением нитратов разводили в 4 раза.

Концентрацию 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) в эритроцитах определяли с помощью метода ЯМР [25]. Эритроциты выделяли из гепаринизированной крови и три раза промывали в среде Хенкса на холоду.

Определение летучих нитрозаминов (НА) в сыворотке крови и

моче проводили с использованием системы газовый хроматограф — термальный анализатор энергии "ТЕА 502А" [26]. Выделение НА из образцов крови осуществляли трехкратной прямой экстракцией этилацетатом (в соотношении 1:1). Экстракт осушали над безводным сернокислым натрием, концентрировали до 0,5 мл при слабом нагревании в струе газообразного азота и хранили в запаянных ампулах в холодильнике. Для выделения НА из мочи использовали дистилляцию с водяным паром и последующую экстракцию в хлористый метилен [27]. Полученные образцы концентрировали при слабом нагреве ( $35-40^\circ\text{C}$ ) под струей газообразного азота.

Для ЭПР-спектроскопических исследований ткань печени помещали в тефлоновую пресс-форму и замораживали в жидком азоте. Сигнал ЭПР образцов регистрировали на радиоспектрометре "Varian E-109" при следующих условиях: напряженность магнитного поля  $2500-3500 \text{ Gs}$ , мощность СВЧ —  $5 \text{ мВт}$  (для регистрации сигнала свободных радикалов  $0.2 \text{ мВт}$ ), температура жидкого азота. В спектре ЭПР ткани печени определяли величины сигналов, которые характерны для цитохрома P-450 с гемовым железом в низкоспиновой окисленной форме ( $g=2.25$ ), свободных радикалов, представленных митохондриальными флавопротеинами в свободнорадикальной семихиноновой форме ( $g=2.00$ ), железосерных белков митохондриальной дыхательной цепи с негемовым восстановленным железом ( $g=1.94$ ) и молибдена, входящего преимущественно в состав активных центров ксантиноксидазы и форматдегидрогеназы ( $g=1.97$ ). Также определяли величину сигнала динитрозильных комплексов негемового железа с SH-группами белков и низкомолекулярных лигандов ( $g_{\text{ср}}=2.03$ ) [28].

При статистической обработке результатов использовали t-критерий Стьюдента [29].

### Результаты и их обсуждение

У крыс через 2 недели после инъекции стрептозотоцина в 7 раз возрос уровень глюкозы в крови (от  $6.16 \pm 0.26$  до  $45.0 \pm 1.97 \text{ ммоль/л}$  крови, соответственно, в контрольной и опытной группе), а также в 6,4 раза увеличилось количество аскорбино-

вой кислоты, выделяемой с мочой в течение суток:  $2.77 \pm 0.33$  и  $17.69 \pm 3.8 \text{ мг/кг}$  массы тела. Увеличение экскреции с мочой аскорбиновой кислоты характерно для стрептозотоцинового диабета у крыс, способных к ее синтезу с использованием глюкозы [30]. В эритроцитах стрептозотоциновых крыс уровень 2,3-ДФГ возрос с  $114,49 \pm 5,9$  отн. ед. (контроль) до  $129,2 \pm 4,25$  отн. ед. ( $n=7$ ). Изменение этого показателя также характерно для диабета [31] и направлено на поддержание нормального сродства  $\text{O}_2$  к гемоглобину, нарушенного в результате его гликозилирования [32]. Наблюдалось увеличение (на 36%) активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови (табл.1.). Согласно исследованиям [33], увеличение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови при стрептозотоциновом диабете у крыс происходит за счет ее изоформы, высвобождаемой из тонкого кишечника.

При стрептозотоциновом диабете существенно интенсифицируется аскорбат-зависимое и, особенно, ферментативное перекисное окисление липидов (ПОЛ) (табл.2). Последнее указывает на участие в инициации образования свободных радикалов с высокой окислительной способностью ферментных систем, которые используют НАДФН и НАДН [34-36]. Таким образом, все указанные показатели отражают метаболические изменения, которые характерны для диабета и в той или иной мере наблюдаются при стрептозотоциновом диабете у лабораторных животных и больных сахарным диабетом.

В условиях экспериментального диабета у крыс при неизменной N-денитрозирующей активности на 30% снизилась N-деметилирующая НДМА активность (табл.3). Согласно данным литературы [9], именно N-деметилирующий путь биотрансформации НДМА обуславливает его генотоксическое и канцерогенное действие. Нами это подтверждено в эксперименте на перитонеальных макрофагах, показавшем, что цитотоксичность НДМА не связана с его N-денитрозированием [37]. Отсюда можно сделать вывод, что при стрептозотоциновом диабете способность N-нитрозосоединений, в частности НДМА, реализовать свое генотоксическое и канцерогенное действие на организм

Таблица 1

**Активность щелочной фосфатазы (мкмоль фенола/л · с) в сыворотке крови**

| Действующий фактор | Группа животных |                        |
|--------------------|-----------------|------------------------|
|                    | контрольная     | диабетическая          |
| отсутствует        | 1,40 ± 0,12     | 1,90 ± 0,07*           |
| NO                 | 1,59 ± 0,16     | 1,96 ± 0,14**          |
| NO + АП            | 3,91 ± 0,51 *   | 5,37 ± 0,37 *, **, *** |
| NO + АП + МП       | 4,21 ± 0,45 *   | 4,45 ± 0,46 *, ***     |

Примечания к этой и табл. 2-5 : \* —  $p < 0,05$  относительно интактных контрольных крыс;

\*\* —  $p < 0,05$  относительно соответствующих групп контрольных крыс;

\*\*\* —  $p < 0,05$  по отношению к группе диабетических крыс (без дополнительных воздействий).

Таблица 2

**Влияние предшественников эндогенного синтеза НДМА на интенсивность ПОЛ в печени крыс при стрептозотоциновом диабете**

| Группы животных       | ПОЛ, нмоль/г ткани |                    |                     |                     |
|-----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
|                       | фоновое            | спонтанное         | аскорбат-зависимое  | ферментативное      |
| Контроль              | 8,50 ± 1,0         | 22,36 ± 1,77       | 665,1 ± 21,9        | 1158,5 ± 111,5      |
| Диабет                | 5,68 ± 1,36        | 22,81 ± 2,33       | 703,3 ± 21,3        | 1914,0 ± 106,7 I*   |
| NO                    | 8,82 ± 0,59        | 32,97 ± 5,82       | 750,0 ± 67,9        | 2200,2 ± 150,3 *    |
| Диабет + NO           | 8,57 ± 1,18        | 27,73 ± 3,71       | 878,2 ± 48,9*, ***  | 2229,6 ± 97,0* **** |
| NO + АП               | 12,52 ± 1,18*      | 35,18 ± 3,46*      | 1147,5 ± 89,4*      | 2187,6 ± 92,8       |
| Диабет + NO + АП      | 12,48 ± 1,16*, *** | 36,54 ± 1,52*, *** | 1025,7 ± 77,6*, *** | 1995,3 ± 67,5*      |
| NO + АП + МП          | 8,79 ± 0,39        | 21,15 ± 2,62       | 770,0 ± 61,3        | 2083,4 ± 92,1*      |
| Диабет + NO + АП + МП | 9,26 ± 0,76***     | 22,22 ± 2,52       | 847,7 ± 39,69* ***  | 2162,13 ± 129,7*    |

уменьшается.

На изменения функции цитохрома Р-450, который отвечает за монооксигеназное окисление ксенобiotиков, включая и НДМА, при стрептозотоциновом диабете указывают данные ЭПР-спектроскопии (табл.4). Содержание цитохрома Р-450 с гемовым железом в низкоспинной окисленной форме при стрептозотоциновом диабете увеличилось на 23%. Полученные результаты отличаются от данных ряда исследований, указывающих на возрастание при сахарном диабете активности ответственной за биотрансформацию N-нитроаминов изоформы цитохрома Р-450 — 2E1 (CYP2E1) [13-16], что, возможно, связано с особенностью превращения конкретно НДМА и использованной экспериментальной модели диабета.

У стрептозотоциновых крыс концентрация нитратов в сыворотке крови и их экскреция с мочой сни-

жены относительно контрольной группы животных почти на 20% и 30% (табл.5).

При оценке состояния обмена NO в организме при экспериментальном диабете можно пренебречь незначительными изменениями уровня нитритов в сыворотке крови и в суточной моче, которое было на 2 порядка ниже, чем количество нитратов. Другими исследованиями, в отличие от наших, показано, что при стрептозотоциновом диабете у крыс уровень нитратов в моче возрастает, что объясняют усилением синтеза в организме реактивных форм кислорода, а не NO [38, 39]. Эти различия могут быть связаны с тем, что используемые модели диабета отличались стадией развития, выраженностью процесса или временем и способом сбора мочи.

Используемая нами модель стрептозотоцинового диабета в большей степени приближается к

состоянию обмена NO, которое наблюдается у больных сахарным диабетом. Последние (особенно те, у которых отмечаются ацидоз, кислородное голодание, не поддающиеся лечению язвы или раны) имеют пониженную способность к синтезу NO и низкий уровень содержания нитратов в моче [40, 41]. Сниженная продукция NO у больных сахарным диабетом подтверждается и тем фактом, что в выдыхаемом ими воздухе обнаруживаются более низкие концентрации NO по сравнению со здоровыми лицами [42, 43]. Ингаляционное воздействие NO на крыс контрольной группы существенно не сказывалось на активности щелочной фосфатазы (табл.1) и ЭПР-показателях (табл.4), но, очевидно, в связи с возникновением гемической гипоксии на 90% усиливало ферментативное ПОЛ (табл.2). При этом воздействии на 19% снижалась N-денитрозирующая активность пече-

Влияние предшественников эндогенного синтеза НДМА на N-деметилирующую и N-денитрозирующую активности в печени контрольных и диабетических крыс

| Действующий фактор | Контрольные крысы                                                         |                                                                      | Крысы с диабетом                                                          |                                                                      |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
|                    | N-деметилирующая активность, нмоль $\text{CH}_2\text{O}$ /мин на мг белка | N-денитрозирующая активность, нмоль $\text{NO}_2^-$ /мин на мг белка | N-деметилирующая активность, нмоль $\text{CH}_2\text{O}$ /мин на мг белка | N-денитрозирующая активность, нмоль $\text{NO}_2^-$ /мин на мг белка |
| Отсутствует        | $0,33 \pm 0,02$                                                           | $0,32 \pm 0,02$                                                      | $0,23 \pm 0,02^*, **$                                                     | $0,32 \pm 0,03$                                                      |
| NO                 | $0,34 \pm 0,04$                                                           | $0,24 \pm 0,02^*$                                                    | $0,27 \pm 0,03$                                                           | $0,26 \pm 0,01^*, ***$                                               |
| NO + АП            | $0,31 \pm 0,03$                                                           | $0,18 \pm 0,01^*$                                                    | $0,24 \pm 0,03^*$                                                         | $0,14 \pm 0,03^*, ***$                                               |
| NO + АП + МП       | $0,26 \pm 0,03^*$                                                         | $0,18 \pm 0,01^*$                                                    | $0,22 \pm 0,03^*$                                                         | $0,15 \pm 0,02^*, ***$                                               |

Таблица 4

Влияние предшественников эндогенного синтеза НДМА на величины сигналов ЭПР- спектров (в отн. един.) печени крыс в условиях стрептозотоцинового диабета

| Группы животных       | Цитохром P-450            | Мо-центры               | Железо-серные центры (ЖСЦ)   | Свободные радикалы    |
|-----------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------|
| Контроль              | $71.13 \pm 5.87$          | $13.63 \pm 2.45$        | $148.50 \pm 21.72$           | $32.27 \pm 5.17$      |
| Диабет                | $87.29 \pm 17.6^*$        | $12.57 \pm 4.08$        | $144.00 \pm 11.73$           | $30.36 \pm 4.00$      |
| NO                    | $84.71 \pm 13.47$         | $15.25 \pm 5.23$        | $144.00 \pm 12.51$           | $34.00 \pm 3.78$      |
| Диабет + NO           | $93.83 \pm 5.19^*$        | $14.00 \pm 4.24$        | $136.00 \pm 2.90$            | $31.50 \pm 3.96$      |
| NO + АП               | $170.4 \pm 11.37^*, ***$  | $11.71 \pm 4.57$        | $142.30 \pm 10.80$           | $32.67 \pm 1.51$      |
| Диабет + NO + АП      | $189.00 \pm 20.46^*, ***$ | $15.50 \pm 6.19$        | $143.80 \pm 13.38$           | $28.80 \pm 1.64^{**}$ |
| NO + АП + МП          | $166.60 \pm 20.91^*, ***$ | $19.17 \pm 3.55^*, ***$ | $123.20 \pm 7.40^*, ***$     | $33.00 \pm 1.00$      |
| Диабет + NO + АП + МП | $149.60 \pm 24.24$        | $24.29 \pm 4.89^*, ***$ | $114.50 \pm 4.87^*, **, ***$ | $31.50 \pm 3.10$      |

Таблица 5

Содержание нитритов, нитратов и НДМА в сыворотке крови и суточной моче крыс при стрептозотоциновом диабете и воздействии предшественников эндогенного синтеза НДМА

| Группы животных       | Нитриты                   |                     | Нитраты               |                             | НДМА                  |                    |
|-----------------------|---------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------|
|                       | сыворотка крови, мг/л     | суточная моча, мкг  | сыворотка крови, мг/л | суточная моча, мкг          | сыворотка крови, мг/л | суточная моча, мкг |
| Контроль              | $0,20 \pm 0,03$           | $2,4 \pm 0,5$       | $1,34 \pm 0,09$       | $283,4 \pm 10,8$            | н.о.                  | н.о.               |
| Диабет                | $0,24 \pm 0,07$           | $1,4 \pm 0,2^*$     | $1,09 \pm 0,10^*$     | $206,9 \pm 21,9^*$          | н.о.                  | н.о.               |
| NO                    | $0,15 \pm 0,03$           | $3,1 \pm 0,2$       | $0,89 \pm 0,11$       | $524,1 \pm 9,5^*$           | н.о.                  | н.о.               |
| Диабет+NO             | $0,22 \pm 0,05$           | $1,7 \pm 0,4^{**}$  | $1,51 \pm 0,48$       | $261,7 \pm 7,60^{**}$       | н.о.                  | н.о.               |
| NO + АП               | $0,16 \pm 0,01$           | $4,6 \pm 0,4^*$     | $1,30 \pm 0,07$       | $1104,7 \pm 250,9^*$        | н.о.                  | $0,020 \pm 0,010$  |
| Диабет + NO + АП      | $0,12 \pm 0,02^{**}, ***$ | $4,2 \pm 0,8^{***}$ | $1,23 \pm 0,16$       | $904,1 \pm 134,0^{***}$     | н.о.                  | следы              |
| NO + АП + МП          | $0,20 \pm 0,03$           | $6,1 \pm 1,7^*$     | $1,02 \pm 0,07$       | $1747,2 \pm 372,1^*$        | н.о.                  | $0,034 \pm 0,016$  |
| Диабет + NO + АП + МП | $0,13 \pm 0,02^{**}, ***$ | $5,7 \pm 0,4^{***}$ | $1,12 \pm 0,16$       | $1325,0 \pm 70,5^{**}, ***$ | н.о.                  | $0,020 \pm 0,007$  |

Примечание: н.о. — не определяется.

ни (табл.3) и вследствие окисления NO в нитрат на 85% увеличивалось его количество в экскретируемой моче (табл.5). У диабетических крыс под влиянием ингаляции NO также отмечается снижение N-денитрозирующей активности, усиление ПОЛ (ферментативного и аскорбатзависимого) и увеличение экскреции

нитратов, хотя и менее значительное, чем у контрольных крыс.

Введение контрольным и диабетическим крысам перед ингаляцией NO амидопирин привело к значительному возрастанию активности щелочной фосфатазы, что, возможно, отражает повреждение клеток, вызванное высокой дозой АП. Также

наблюдалось усиление аскорбатзависимого ПОЛ, повышение содержания цитохрома P-450 с гемовым железом в низкоспиновой окисленной форме. Еще больше снизилась N-денитрозирующая активность. Под влиянием АП более, чем в 2 раза возросло количество выделяемого с мочой нитрат-аниона (табл.1-5).

Может быть АП усиливает окислительную способность клеток и(или) выделительную функцию почек.

4-Метилпиразол, который является сильным ингибитором биотрансформации НДМА [44], существенно не влияет на характер действия NO и АП в отношении исследуемых показателей у контрольных и диабетических крыс (табл. 1-5). Увеличение сигнала ЭПР, характерного для цитохрома Р-450, под влиянием NO, а особенно амидопирина и метилпиразола, отражает непосредственное взаимодействие этих соединений с активными центрами цитохрома Р-450 в качестве субстрата или ингибитора.

В моче контрольных и диабетических крыс не выявлено присутствия НДМА. Поступление в организм крыс NO и АП приводит к появлению в моче НДМА, количество которого у контрольных крыс было существенно, а у диабетических животных определялось в виде следов. Введение этих предшественников

эндогенного синтеза НДМА совместно с ингибирующим N-деметилюющую и N-денитрозирующую активности цитохрома Р-450 метилпиразолом приводило к повышению содержания этого канцерогена в моче контрольных крыс в 1.7 раза (табл. 5). Содержание НДМА в моче диабетических крыс также возросло, но было значительно меньшим, чем у контрольных животных. Следовательно, у крыс с экспериментальным сахарным диабетом наблюдается изменение интенсивности обмена НДМА в результате снижения уровня его синтеза и биотрансформации, в частности, в результате угнетения N-деметилюющей активности печени (табл. 5).

Таким образом, в условиях стрептозототинового диабета у крыс уменьшается экскреция с мочой нитрат-аниона, образующегося в организме из NO как эндогенного, так и экзогенного происхождения, что способствует сохранению фонда NO и его метаболитов в организме. Снижается эндогенное образование

НДМА из предшественников, что, очевидно, связано с менее благоприятными для N-нитрозирования условиями в желудке, тканях и жидкостях организма (рН, концентрация и соотношение предшественников синтеза, наличие ингибиторов и т.д.), а также снижается скорость деметилюрования НДМА. Так как в организме контрольных и диабетических крыс, даже в условиях, способствующих синтезу и препятствующих биотрансформации НДМА, не обнаруживается его значительное накопление, этот показатель не всегда может служить биомаркером опасности N-нитрозосоединений. Опасность влияния на организм НДМА и других N-нитрозосоединений заключается, очевидно, в скорости биотрансформации, которая существенно преобладает над синтезом и определяет общетоксические эффекты этих соединений. Полученные результаты дают основание предположить меньшую опасность воздействия на организм N-нитрозосоединений при диабете.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Van Maanen J.M.S., Albering H.J., de Kok T.M.C.M., van Breda S.G.J., Curfs D.M.J., Vermeer I.T.M., Ambergen A.W., Wolffenbuttel B.H.R., Kleinjans J.C.S., Reeser H.M.* Does the Risk of Childhood Diabetes Mellitus Require Revision of the Guideline Values for Nitrate in Drinking Water? // *Environment. Health Perspect.*—2000.—108, N 5.—P. 457-461.
2. *Longnecker M. P., Daniels J.L.* Environmental contaminants as etiologic factors for diabetes // *Environ. Health Perspect.*—2001.—109, N 6. — P. 871-876.
3. *Рубенчик Б.Л., Костоюковский Я.Л., Меламед Д.Б.* Образование канцерогенных нитрозосоединений в природе и в организме // *Успехи соврем. биол.*—1990.—109.—С.393-407.
4. *Carisson P.O., Flodstrom M., Sandier S.* Islet blood flow in multiple low dose streptozotocin-treated wild-type and inducible nitric oxide synthase-deficient mice // *Endocrinology.*—2000.—141, N 8.— P. 2752-2757.
5. *Spinas G. A.* The Dual Role of Nitric Oxide in Islet Я-Cells // *News Physiol. Sci.*—1999.—14, N 2.—P. 49-54.
6. *Johannesen J., Pie A., Pociot F., Kristiansen O. P., Karlsen A. E., Nerup J.* Linkage of the human inducible nitric oxide synthase gene to type 1 diabetes // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*—2001.—86, N 6.— P. 2792-2796.
7. *Durón-Reyes G., Pascoe-Lira D., Vilar-Rojas C. et al.* Diabetogenic Effect of STZ Diminishes with the Loss of Nitric Oxide: Role of Ultraviolet Light and Carboxy-PTIO // *Pharmacology.*—2004.—71, N1.— P. 17-24.
8. *Дмитренко Н.П., Кишко Т.О., Шандренко С.Г.* О роли ксантиноксидазы в цитотоксическом действии нитратов и нитритов // *Укр. биохим. журн.*—2001.—73, № 6.—С.—113-118.
9. *Tsutsumi M., Matsuda Y., Takada. A.* Role of ethanol-inducible cytochrome P-450 2E1 in the development of hepatocellular carcinoma by the chemical carcinogen, N-nitrosodimethylamine // *Hepatology.*—1993.—18, N 6.— P. 1483-1489.
10. *Camus A.M., Geneste O., Honkakoski P., et al.* High variability of nitrosamine metabolism among individuals: role of cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of N-nitrosodimethylamine and nitrosodiethylamine in mice and humans // *Mol. Carcinog.*—1993.—7, N-4.—P. 268-275.
11. *Lin H.L., Parsels L.A., Maydfum J., Hollenbrg P.F.* N-Nitrosodimethylamine-mediated cytotoxicity in a cell line expressing P450 2E1: evidence for apoptotic cell death // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*—1999.—157, N 2.— P. 117-1124.
12. *Kwon N.S., Lee S.H., Choi C.S., Kho T., Lee H.S.* Nitric oxide generation from streptozotocin // *FASEB Journal.*—1994.—8.— P.— 529-533.
13. *Thummel K.E. and Schenkman J.B.* Effects of testosterone and growth hormone treatment on hepatic microsomal P450 expression in the diabetic rat // *Mol. Pharmacol.*—1990.—37, N 1.— P.119-129.
14. *Woodcroft K. J., Novak R. F.* Insulin Differentially Affects Xenobiotic-Enhanced, Cytochrome P-450 (CYP)2E1, CYP2B, CYP3A, and CYP4A Expression in Primary Cultured Rat Hepatocytes // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*—1999.—289, N 2.— P. 1121-1127.
15. *Chen T.G., Tai Y.T., Chang H.C., et al.* Modulation of cytochrome P450-dependent monooxygenases in streptozotocin-induced diabetic hamster: II. Reverse role of insulin in P450 activity and defluorination // *Acta Anaesthesiol. Sin.*—2000.—38, N 2.— P. 65-72.
16. *Moncion A., Truong N. T., Garrone A., et al.* Identification of a 16-Nucleotide Sequence That Mediates Post-transcriptional Regulation of Rat CYP2E1 by Insulin // *J. Biol. Chem.*—2002.—277, N 48.— P. 45904-45910.
17. *Сноз С.В., Дмитренко Н.П.* N-деметилюющая и денитрозирующая активность печени и лимфоцитов тимуса и селезенки крыс при воздействии симазина и нитрита натрия // *Укр. биохим. журн.*—1993.—65, N4.—С. 94-98.
18. *Raza H., Ahmed I., John A., Sharma A.K.* Modulation of xenobiotic metabolism and oxidative stress in chronic streptozotocin-induced diabetic rats fed with Momordica charantia fruit extract // *J. Biochem. Mol. Toxicol.*—

- 2000.—14, N3.—P. 131-139.
19. *Shankar K., Vaidya V. S., Apte U. M. et al.* Type 1 Diabetic Mice Are Protected from Aceta-minophen Hepatotoxicity // *Toxicol. Sci.*— 2003.— 73, N 2.— P. 220-234.
  20. *Петридес П., Вайс Л., Леффлер Г., Вуйланд О.* Сахарный диабет.— Москва, "Медицина", 1980.—200 с.
  21. *Гацко Г.Г., Мажула Л.М., Позднякова Е.А.* Определение малонового диальдегида // *Бюл. эксперим. биол. и мед.*—1982.—4.—С. 30-32.
  22. *Сноз С.В., Дмитренко Н.П.* N-деметилюющая и денитрозирующая активность печени, лимфоцитов тимуса и селезенки крыс при воздействии симазина и нитрита натрия // *Укр. биохим. журн.*—1993.—65, Т 4.—С.94-98.
  23. ГОСТ 24481-80. Вода питьевая.— 29 декабря 1980 г.
  24. *Роома М.Я., Канн Э.М., Веттис К.* О применении кадмиевой колонки для определения нитратов в моче. /Канцерогенные N-нитрозосоединения и их предшественники — образование и определение в окружающей среде: Тез. V Всесоюз. симп.— Таллин, 1984.—С.210-212.
  25. *Mikhailenko V.M., Philchenkov A.A., Zavelevich M.P.* Analysis of <sup>1</sup>H-NMR-detectable mobile lipid domains for assessment of apoptosis induced by inhibitors of DNA synthesis and replication // *Cell Biology Int.*— 2005. — 29, N. 1.— P. 33-39.
  26. *Fine D.H., Rounbehler D.P.* Analysis of volatile N-nitroso compounds by combined gas chromatography and thermal energy analysis. /*Environmental N-nitroso compounds, analysis and formation.*— Lyon: IARC, 1976.— P.117-127.
  27. *Канн Ю.М.* Обнаружение и количественное определение летучих с водным паром N-нитрозаминов в пищевых продуктах (Метод. рекомендации).— Таллинн, 1981.— 40 с.
  28. *Ажипа Я.И.* Медико-биологические аспекты применения метода ЭПР.— М.: Наука, 1983.—528 с.
  29. *Лакин Г.Ф.* Биометрия.— М.: Высшая школа, 1990.— 352 с.
  30. *Yue D.K., McLennan S., Fisher E. et al.* Ascorbic acid metabolism and polyol pathway in diabetes // *Diabetes.*— 1989.— 38, N 2.— P. 257-261.
  31. *Bodnar P.N., Pristupik A.M.* Assessment of the 2,3-diphosphoglycerate content of erythrocytes in diabetes mellitus // *Probl. Endokrinol.* -1982.—28, N 5.—P. 15-17.
  32. *Alder V.A., Yu D.Y., Su E.N., Cringle S.J.* Comparison of hematologic parameters in normal and streptozotocin-induced diabetic rats // *Lab. Anim. Sci.*— 1992.—42, N 2.—P. 170-173.
  33. *Unakami S., Komoda T., Sakagishi Y.* Translocation of intestinal alkaline phosphatase in streptozotocin-induced diabetic rats // *Int. J. Biochem.*— 1990.—22, N 11.— P. 1325-1331.
  34. *Obrosova I., Cao X., Greene D.A., Stevens M.J.* Diabetes-induced changes in lens antioxidant status, glucose utilization and energy metabolism: effect of DL-alpha-lipoic acid // *Diabetologia.*—1998.—41, N12.—P.1442-1450.
  35. *Prakasam A., Sethupathy S., Pugalendi K. V.* Erythrocyte redox status in streptozotocin diabetic rats: effect of *Casaria esculenta* root extract // *Pharmazie.*— 2003.—58, N 12.— P. 920-924.
  36. *Никифоров О.Н., Сазонова О.В., Суханова Л.Я. и др.* Перекисное окисление липидов и состояние системы антиоксидантной защиты у больных инсулин-зависимым сахарным диабетом // *Проблемы эндокринологии.*—1997.— 43, №5.— С.16-19.
  37. *Смердова Л.М., Шандренко С.Г., Дмитренко М.П.* Метод визначення участі оксиду азоту в механізмі дії хімічних речовин // *Совр. проблемы токсикологии.*—2002.— №4.—С.93-95.
  38. *Kobayashi T., Kamata K.* Effect of chronic insulin treatment on NO production and endothelium-dependent relaxation in aortae from established STZ-induced diabetic rats // *Atherosclerosis.*— 2001.— 155, N3.—P. 313-321.
  39. *Maree A., Peer G., Iaina A., Blum M. et al.* Nitric oxide in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats // *Clin. Sci.*— 1996.—90, N 5. — P. 379-384.
  40. *Boykin J.V.* Diabetes impaired wound healing predicted by urinary nitrate assay; A preliminary retrospective study // *Wounds.*— 1999.— 11, N 3. — P. 62-69.
  41. *Thomas B.* Nitric oxide and its role in health and diabetes. Part 3. NO (nitric oxide) metabolism in diabetic patients. /<http://www.diabetesincontrol.com/burkearchive/nitricoxide3.shtml>
  42. *Schmetterer L., Findl O., Fasching P., Ferber W., et al.* Nitric oxide and ocular blood flow in patients with IDDM // *Diabetes.*— 1997.— 46, N 4. — P. 653-658.
  43. *Pieper G. M.* Review of Alterations in Endothelial Nitric Oxide Production in Diabetes // *Hypertension.*— 1998.—31, N 7. — P. 1047-1060.
  44. *Phillips J.C., Lake B.G., Gangolli S.D., Grasso P., Lloyd A.G.* Effects of pyrazole and 3-amino-1,2,4-triazole on the metabolism and toxicity of dimethylnitrosamine in the rat // *J. Natl. Cancer Inst.*— 1977.—58, N 3.—P. 629-633.

**М.П.Дмитренко, В.М.Михайленко, А.А.Главін, С.В.Сноз,  
Т.О.Кішко, С.Г.Шандренко, Л.М.Смердова  
ОБМІН N-НІТРОСОДИМЕТИЛАМІНУ  
У ШУРІВ  
З СТРЕПТОЗОТОЦИНОВИМ ДІАБЕТОМ**

Через 2 тижні після інтраперитонеальної ін'єкції стрептозоточину в дозі 55 мг/кг дорослим шурмам-самцям лінії Wistar у них відносно контрольних тварин підвищився рівень глюкози і активність лужної фосфатази в сироватці крові, а також кількість аскорбінової кислоти, яка виводиться з сечею, еритроцитарний вміст 2,3-дифосфогліцерату.

Показано, що в умовах стрептозоточинового діабету зменшилася екскреція з сечею нітрат-аніону, який утворюється в організмі з NO ендогенного та екзогенного походження, а також знизилася швидкість деметилювання НДМА в печінці і його ендогенне утворення з попередників. Останнє, можливо, пов'язано з менш сприятливими умовами (рН, концентрація та співвідношення попередників, наявність інгібіторів) в шлунку, тканинах і рідинах організму діабетичних шурів.

Відсутність значного накопичення НДМА у контрольних шурів навіть в умовах, сприятливих для його утворення в організмі, може вказувати на те, що стосовно до цього N-нітрозаміну, як, можливо і до багатьох інших, швидкість біотрансформації суттєво перевищує синтез, визначає токсичний ефект і є основним біомаркером небезпеки впливу на організм. Отримані дані дозволяють припустити меншу небезпеку дії на організм НДМА при діабеті.

**M.P.Dmitrenko, V.M.Mihailenko, A.A.Glavin, S.V.Snoz,  
T.O.Kishko, S.G.Shandrenko, L.M.Smerdlova  
METABOLISM OF N-NITROSODIMETHYLAMINE IN RATS WITH DIABETES INDUCED BY  
STREPTOZOTOCINE**

Biotransformation of N-nitrosodimethylamine (NDMA) and its synthesis has been investigated under a rat model of diabetes induced by streptozotocine with a nitric oxide inhalation and a 4-methylpyrazole installation as a inhibitor of P-450 cytochrome.

It has been detected that, in two weeks after a IP-injection of streptozotocine at 55 mg/kg dose into Wistar male rats, a level of glucose, an activity of alkaline phosphatase in blood serum, quantity of ascorbic acid in urine and 2,3-diphosphoglycerate in erythrocytes are increased.

It has been revealed that an excretion of nitrate-anion, which are formed in an organism from NO endogenous and exogenous sources, are decreased. Also, a rate of NDMA demethylation in a liver tissue and NDMA endogenous formation from its predecessors are slowed down. Perhaps, these facts are concerned with less auspicious condition of N-nitrosation (pH, concentration and ratio of its predecessors, a presence of inhibitors) in a stomach, tissues and liquids of an organism of diabetic rats.

Absence of a considerable accumulation of NDMA in control rats even under favorable conditions for its formation in an organism can indicate that a rate of biotransformation of this N-nitrosoamine as, perhaps, many others, prevails essentially over its synthesis. This process designates a toxic effect and can be used as a main biomarker of a dangerous influence upon an organism. Obtained data allows to presume that NDMA effect upon an organism is less dangerous under diabetes.