

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«Воронежский государственный университет»

На правах рукописи



Горина Екатерина Ильинична

**ВОЗДЕЙСТВИЕ БИГУАНИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА АНТИОКСИДАНТНЫЙ
СТАТУС КРЫС ПРИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ СТРЕПТОЗОЦИНОМ
И ПРОТАМИН-СУЛЬФАТОМ**

Специальность 03.01.04. - Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук,
профессор Попова Т.Н.

Воронеж 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Сахарный диабет	12
1.1.1. Классификация и диагностика сахарного диабета.....	13
1.1.2. Этиология, патогенез и принципы терапии сахарного диабета.....	13
1.2. Свободнорадикальное окисление биомолекул	16
1.2.1. Физиологическое значение радикалов и их роль в развитии патологических процессов.....	18
1.2.2. Роль окислительного стресса в развитии сахарного диабета.....	20
1.3. Антиоксидантная система	21
1.3.1. Ферментативное звено антиоксидантной системы	23
1.3.1.1. Супероксиддисмутаза и каталаза	23
1.3.1.2. Глутатионовая антиоксидантная система и НАДФН-генерирующие ферменты	25
1.3.2. Неферментативное звено антиоксидантной системы	32
1.4. Бигуанидиновые производные	35
1.4.1. Биологическая активность	35
1.4.2. Бигуаниды в терапии сахарного диабета 2 типа.....	36
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	39
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	39
2.1. Объект исследования.....	39
2.2. Методы исследования	39
2.2.1. Моделирование патологического состояния у крыс.....	39
2.2.2. Синтез бигуанидиновых производных.....	41
2.2.3. Оценка токсичности тестируемых соединений.....	42
2.2.4. Подготовка материала для исследования.....	43
2.2.5. Определение уровня глюкозы	44
2.2.6. Оценка антиоксидантного статуса.....	45
2.2.6.1. Определение интенсивности биохемилюминесценции.....	45
2.2.6.2. Определение содержания диеновых конъюгатов.....	45
2.2.6.3. Определение степени окислительной модификации белков.....	46
2.2.6.4. Оценка степени фрагментации ДНК.....	46
2.2.6.4.1. Выделение тотальной ДНК.....	47
2.2.6.4.2. Электрофорез ДНК.....	48

2.2.7. Измерение активности ферментов.....	49
2.2.7.1. Определение активности ферментов, сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями НАДФ.....	49
2.2.7.1.1. Определение активности глутатионпероксидазы.....	49
2.2.7.1.2. Определение активности глутатионредуктазы.....	50
2.2.7.1.3. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.....	50
2.2.7.1.4. Определение активности НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы.....	50
2.2.7.2. Определение активности глутатионтрансферазы.....	51
2.2.7.3. Определение активности аконитатгидратазы.....	51
2.2.7.4. Определение активности супероксиддисмутазы.....	52
2.2.7.5. Определение активности каталазы.....	52
2.2.8. Определение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов.....	53
2.2.8.1. Выделение тотальной РНК.....	53
2.2.8.2. Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция.....	54
2.2.9. Определение содержания компонентов неферментативной антиоксидантной системы.....	55
2.2.9.1. Определение концентрации восстановленного глутатиона.....	55
2.2.9.2. Определение содержания цитрата.....	56
2.2.10. Определение содержания общего белка.....	58
2.3. Статистическая обработка экспериментальных данных.....	58
ГЛАВА 3. ВОЗДЕЙСТВИЕ БИГУАНИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ У КРЫС.....	60
3.1. Поиск бигуанидиновых производных с целевой биологической активностью.....	60
3.2. Определение токсичности N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина и 1,3-диметил 5- [(карбамимидамометанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата.....	62
3.3. Воздействие бигуанидиновых производных на уровень гликемии у крыс.....	63
3.4. Оценка интенсивности свободнорадикального окисления биомолекул в тканях и сыворотке крови крыс с гипергликемией при введении N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина и 1,3-диметил 5- [(карбамимидамометанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата.....	66
3.4.1. Влияние бигуанидиновых производных на интенсивность биохемилюминесценции и уровень первичных продуктов перексидного окисления липидов в тканях и сыворотке крови крыс с гипергликемией.....	66

3.4.2. Окислительная модификация белков в тканях и сыворотке крови крыс с гипергликемией при введении N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина и 1,3-диметил 5- [(карбамимидамометанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата.....	75
3.4.3. Оценка степени фрагментации ДНК в тканях крыс с гипергликемией при введении бигуанидиновых производных.....	79
3.4.4. Воздействие бигуанидиновых производных на активность аконитатгидратазы и уровень цитрата в тканях и сыворотке крови крыс при развитии гипергликемии	82
ГЛАВА 4. ВОЗДЕЙСТВИЕ БИГУАНИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ КРЫС ПРИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ.....	90
4.1. Активность супероксиддисмутазы и каталазы в тканях и сыворотке крови крыс при введении бигуанидиновых производных на фоне развития патологии.....	90
4.2. Уровень транскриптов генов супероксиддисмутазы и каталазы в тканях крыс при введении бигуанидиновых производных на фоне развития патологии.....	98
4.3. Влияние бигуанидиновых производных на активность ферментов глутатионового звена антиоксидантной системы в тканях и сыворотке крови крыс при гипергликемии.....	103
4.4. Уровень транскриптов генов глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в тканях крыс при введении бигуанидиновых производных на фоне развития гипергликемии.....	119
4.5. Воздействие N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина и 1,3-диметил 5- [(карбамимидамометанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы в тканях и сыворотке крови экспериментальных животных при гипергликемии.....	122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	131
ВЫВОДЫ.....	137
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	138
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	155

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АГ – аконитатгидратаза;
- АОС – антиоксидантная система;
- АТФ – аденозинтрифосфат;
- АФК – активные формы кислорода;
- АМФК – аденозинмонофосфат-активируемая протеинкиназа;
- БХЛ – биохемилюминесценция;
- Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа;
- ГП – глутатионпероксидаза;
- ГР – глутатионредуктаза;
- ГТ – глутатионтрансфераза;
- ДК – диеновые конъюгаты;
- ДКБ – 1,3-диметил 5- [(карбамимидаметанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилат;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
- ЛД – летальная доза;
- НАД – никотинамидадениндинуклеотид;
- НАДН – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный;
- НАДФ – никотинамидадениндинуклеотид фосфат;
- НАДФ-ИДГ – НАДФ-изоцитратдегидрогеназа;
- НАДФН – никотинамидадениндинуклеотид фосфат восстановленный;
- НИПМГ – N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидин;
- НСТ – нитросиний тетразолий;
- ОМБ – окислительная модификация белков;
- ОС – оксидативный стресс;
- ПОЛ – пероксидное окисление липидов;
- ПФП – пентозофосфатный путь;
- ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени;
- РНК – рибонуклеиновая кислота;
- СД – сахарный диабет;
- СД1 – сахарный диабет 1 типа;
- СД2 – сахарный диабет 2 типа;
- СО – свободнорадикальное окисление;
- СОД – супероксиддисмутаза;

СР – свободный радикал;
СРП – свободнорадикальные процессы;
ТХУ – трихлоруксусная кислота;
ФАД – флавинадениндинуклеотид;
ФМС – феназинметасульфат;
ФНО- α – фактор некроза опухоли альфа;
ц-АМФ – циклический аденозинмонофосфат;
ц-ГМФ – циклический гуанозинмонофосфат;
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;
ЭТЦ – электрон-транспортная цепь;
GLUT – глюкозные транспортёры;
GSH – восстановленный глутатион;
GSSG – окисленный глутатион;
H₂O₂ – пероксид водорода;
Ig – иммуноглобулины;
I_{max} – интенсивность вспышки хемилюминесценции;
NF- κ B – ядерный транскрипционный фактор;
NO – оксид азота;
O₂^{•-} – супероксидный анион-радикал;
OH[•] – гидроксильный радикал;
S – светосумма хемилюминесценции;
ТАЕ – трис-ацетатный электродный буфер;
tg α 2 – величина тангенса угла наклона касательной к кривой хемилюминесценции.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Сахарный диабет 2 типа (СД2), на долю которого приходится 85-90% от общего числа больных сахарным диабетом, является одной из самых серьезных медико-социальных проблем современности, учитывая растущую распространённость патологии, тяжесть и полиорганность поражения, раннюю инвалидизацию и большую летальность вследствие прогрессирования макро- и микроангиопатий [8, 181]. Согласно эпидемиологическим прогнозам, ожидается увеличение количества больных СД2 до 300 миллионов к 2025 году.

Нарушение метаболизма глюкозы в условиях гипергликемии является пусковым фактором в развитии окислительного стресса (ОС) - ключевого звена патогенеза при СД2 и его как микрососудистых, так и сердечно-сосудистых осложнений. Метаболические нарушения при диабете вызывают перепроизводство митохондриального супероксида в эндотелиальных клетках как крупных, так и малых сосудов, а также в миокарде. Увеличение содержания супероксида вызывает активацию ряда процессов, вовлеченных в патогенез осложнений СД2: интенсификацию потока полиольных путей, ведущих к снижению цитозольного уровня НАДФН и восстановленного глутатиона; аутоокисление глюкозы с образованием конечных продуктов гликирования, сопровождающееся нарушением функций белков; гиперактивность гексозаминового пути; образование в результате взаимодействия супероксидного анион-радикала с оксидом азота пероксинитрита в β -клетках поджелудочной железы, что способствует их гибели [180].

Интенсификация свободнорадикальных процессов (СРП) и недостаточность антиоксидантных резервов организма в условиях нарастания ОС при СД2 делает целесообразным поиск веществ-протекторов, обладающих антиоксидантными свойствами, с целью коррекции метаболических нарушений и снижения риска развития осложнений. К соединениям с целевой биологической активностью могут быть отнесены N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидин (НИПМГ) и 1,3-диметил 5-[(карбамимидамометанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилат (ДКБ) – синтетические бигуанидиновые производные, которые были отобраны с помощью программы «структура-свойство» PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances). В настоящее время известно, что некоторые бигуанидиновые производные могут оказывать существенное влияние на окислительный гомеостаз, обладают антиоксидантной активностью, гипогликемическими, антисептическими, кардиопротекторными, противоопухолевыми и другими свойствами [87, 160, 167]. Согласно имеющимся данным, основной механизм действия бигуанидов заключается в повышении утилизации глюкозы

мышцами за счет активации анаэробного гликолиза. Кроме того, бигуаниды тормозят глюконеогенез, распад гликогена в печени, замедляют всасывание глюкозы в тонком кишечнике, а также влияют на пострецепторные механизмы действия инсулина, приводя к улучшению обмена углеводов в организме [95, 149, 151]. Вместе с тем, на данный момент единственным бигуанидом, рекомендованным для фармакотерапии больных СД2, является метформин [71, 77, 104].

Таким образом, актуальной задачей представляется исследование воздействия НИПМГ и ДКБ на антиоксидантный статус при гипергликемии в эксперименте на животных и анализ целесообразности их дальнейших доклинических и клинических испытаний с целью расширения спектра лекарственных средств, применяемых в терапии СД2 – одного из наиболее распространенных социально-значимых заболеваний.

Цель и задачи исследования. Цель работы – исследование воздействия бигуанидиновых производных – N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина и 1,3-диметил 5- [(карбамимидамометанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата, на уровень гликемии, интенсивность свободнорадикальных процессов и функционирование АОС при гипергликемии у крыс.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Оценка влияния бигуанидиновых производных на уровень гликемии у крыс при СД2, индуцированном введением протамин-сульфата и стрептозоцина на фоне высокожировой диеты.
2. Определение токсичности N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина и 1,3-диметил 5- [(карбамимидамометанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата.
3. Анализ воздействия НИПМГ, ДКБ и метформина (препарат сравнения) на интенсивность протекания СРП при гипергликемии в эксперименте на животных.
4. Исследование антиапоптотического действия исследуемых бигуанидиновых производных на фоне развития патологии, индуцированной введением экспериментальным животным протамин-сульфата и стрептозоцина на фоне жировой диеты.
5. Оценка влияния НИПМГ и ДКБ на активность и уровень транскриптов генов супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы при гипергликемии у крыс.
6. Исследование воздействия НИПМГ, ДКБ и метформина на функционирование глутатионовой АОС – активность глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), глутатионтрансферазы (ГТ), содержание восстановленного глутатиона (GSH), а также влияния исследуемых бигуанидов на уровень транскриптов генов ГП и ГР.

7. Определение активности НАДФН-генерирующих ферментов в тканях крыс при введении бигуанидиновых производных животным с гипергликемией, вызванной введением протамин-сульфата, и индуцированной введением стрептозоцина на фоне жировой диеты.

Научная новизна. Впервые осуществлено комплексное исследование воздействия бигуанидиновых производных – НИПМГ и ДКБ на интенсивность свободнорадикального окисления (СО) биомолекул (липидов, белков, нуклеиновых кислот), активность и содержание ферментативных и неферментативных компонентов АОС, ряда ферментов окислительного метаболизма, а также уровень транскриптов генов антиоксидантных ферментов в тканях крыс с гипергликемией. Установлено, что введение НИПМГ и ДКБ при развитии гипергликемии, индуцированной введением как протамин-сульфата, так и стрептозоцина на фоне жировой диеты, приводит к уменьшению интенсивности СРП и коррекции функционирования ферментов АОС в печени, почках, сердце и сыворотке крови крыс. При этом также отмечено снижение интенсивности апоптотических процессов. Выявлено снижение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов в тканях крыс с патологией при введении исследуемых веществ, что соотносится с изменениями активности ферментов. Проведен сравнительный анализ эффективности разных доз исследуемых соединений. Выявлены среднелетальные дозы тестируемых бигуанидиновых производных. Осуществлено исследование воздействия НИПМГ и ДКБ на активность ферментов-поставщиков восстановительных эквивалентов в виде НАДФН для работы глутатионовой АОС в тканях крыс с гипергликемией, индуцированной с помощью различных экспериментальных моделей. Дана сравнительная характеристика ряда параметров СО при введении животным с гипергликемией НИПМГ, ДКБ и метформина (препарата сравнения). Предложена гипотетическая схема воздействия бигуанидиновых производных на антиоксидантный статус при гипергликемии у крыс.

Практическая значимость. Полученные данные о воздействии НИПМГ и ДКБ на свободнорадикальный гомеостаз при гипергликемии у крыс свидетельствуют о возможности применения данных бигуанидиновых производных для коррекции антиоксидантного статуса при СД2. Результаты работы углубляют фундаментальные представления о путях реализации протекторного действия веществ, обладающих антирадикальным потенциалом, что создает основы для развития антиоксидантной терапии и ее применения в комплексном лечении СД2. Вместе с тем, полученные данные могут быть использованы в дальнейшем для доклинических и клинических исследований с целью расширения спектра препаратов, применяемых для лечения СД2.

Материалы работы используются в учебном процессе на медико-биологическом и фармацевтическом факультетах Воронежского государственного университета при чтении курсов «Интеграция обменных процессов в организме», «Свободнорадикальные процессы в биологических системах», «Биологическая химия», «Физико-химические основы патологических процессов», «Ферментативная регуляция метаболизма», а также спецкурсов по патобиохимии и медицинской энзимологии. Кроме того, они используются при проведении практикумов, выполнении курсовых, выпускных квалификационных работ и магистерских диссертаций студентами Воронежского госуниверситета.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на 10-й международной научно-практической конференции «Актуальные достижения науки-2014» (Прага, 2014), на VIII международной научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований» (Москва, 2014), на VII международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной науки в 21 веке» (Махачкала, 2015), в материалах международной научно-практической конференции, посвященной 81-летию Курского государственного медицинского университета и 50-летию фармацевтического факультета «Университетская наука: взгляд в будущее» (Курск, 2016), в сборнике статей «Актуальные вопросы развития территорий: теоретические и прикладные аспекты» (Пермь, 2016), в материалах 6-й международной научно-методической конференции «Фармобразование-2016. Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ» (Воронеж, 2016), в Вестнике современных исследований №1-1(4), №4-1(7), №11-1(14) (Омск, 2017) и в материалах XV международной научно-практической конференции «Наука и образование: сохраняя прошлое, создаём будущее» (Пенза, 2018). Результаты работы были также доложены на научной сессии Воронежского госуниверситета (2017г.).

Публикации. Основные результаты, полученные при выполнении диссертационной работы, изложены в 14 публикациях, из них 4 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 3 из которых включены в системы Web of Science и Scopus.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Воздействие бигуанидиновых производных – N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина и 1,3-диметил 5- [(карбамимидаметанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата, при гипергликемии у крыс, индуцированной введением протамин-сульфата, а также развивающейся на фоне стрептозоциновой модели СД2, оказывало гипогликемический эффект и приводило к торможению интенсивности процессов СО биомолекул и апоптоза.

2. Введение НИПМГ и ДКБ экспериментальным животным при гипергликемии способствует существенному приближению показателей активностей и содержания ключевых компонентов антиоксидантной системы к контрольным значениям.

3. При введении НИПМГ и ДКБ крысам с гипергликемией, индуцированной как протамин-сульфатом, так и стрептозоцином, происходит изменение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов – СОД, каталазы, ГП и ГР, в сторону значений нормы.

4. При действии бигуанидиновых производных на фоне гипергликемии активность ряда ферментов окислительного метаболизма изменяется в направлении контрольных показателей.

Структура и объем работы. Диссертация представлена на 177 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения полученных результатов (2 главы), заключения, выводов, списка литературы (213 источников) и приложения. Иллюстративный материал включает 58 рисунков и 14 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Сахарный диабет

Сахарный диабет (СД) представляет собой группу метаболических заболеваний, характеризующихся гипергликемией, вызванной нарушением секреции инсулина, действия инсулина или и тем, и другим. Хроническая гипергликемия при диабете сопровождается повреждением, дисфункцией и нарушением работы различных органов, особенно глаз, почек, нервов, сердца и кровеносных сосудов [6].

В развитие диабета вовлечены несколько патогенных процессов. Они варьируются от аутоиммунного разрушения β -клеток поджелудочной железы с последующим дефицитом инсулина до аномалий, которые приводят к резистентности к действию инсулина. Основной аномалией в углеводном, жировом и белковом метаболизме при диабете является недостаточное действие инсулина на ткани-мишени. Дефицитное действие инсулина имеет место из-за неадекватной секреции инсулина и / или сбоя ответов тканей на влияние инсулина в одной или нескольких точках комплексных путей гормонального действия. Нарушение секреции инсулина и дефекты в действии инсулина часто сосуществуют у одного и того же пациента, и часто неясно, какая аномалия является основной причиной гипергликемии.

Симптомы выраженной гипергликемии включают полиурию, полидипсию, потерю веса, иногда с многофагией, и помутнение зрения. Нарушение роста и восприимчивость к определенным инфекциям также может сопровождать хроническую гипергликемию. Острые, угрожающие жизни последствия неконтролируемого диабета - гипергликемия с кетоацидозом или некетоцидемическим гиперосмолярным синдромом [41].

Длительные осложнения диабета включают ретинопатию с потенциальной потерей зрения; нефропатию, ведущую к почечной недостаточности; периферическую невропатию с риском язв стопы, ампутаций и суставов Шарко; и вегетативную невропатию, вызывающую желудочно-кишечные, мочеполовые и сердечно-сосудистые симптомы и сексуальную дисфункцию [14]. У пациентов с СД имеют место атеросклеротические, сердечно-сосудистые заболевания, заболевания периферических артерий, а также цереброваскулярные патологии. Также, у пациентов с диабетом часто обнаруживаются гипертензия и аномалии метаболизма липопротеидов [111].

1.1.1. Классификация и диагностика сахарного диабета

По классификации ВОЗ, СД делится на несколько подтипов, но в качестве наиболее встречающихся выделяют два больших подтипа: это СД 1 типа (СД1, инсулинозависимый, иммуноопосредованный, идиопатический) и СД 2 типа (СД2, инсулинонезависимый). Выделяются также по данной классификации специфические типы СД, включающие генетические дефекты функции β -клеток, например MODY-диабет (Maturity Onset Diabetes of the Young – диабет молодых людей), и генетические дефекты действия инсулина. Имеет место СД, вызванный приемом лекарств, воздействием химических агентов и инфекций. Как особый тип диабета у беременных выделяют гестационный СД [3].

Диагностика СД проводится с помощью лабораторных тестов, а также сбора анамнеза путем обследования у специалиста. К основному методу лабораторной диагностики можно отнести определение уровня глюкозы в крови и моче. Нормальная концентрация глюкозы в крови натощак колеблется в пределах 3,3-5,5 ммоль/л. Диагноз СД всегда подтверждается повторным определением гликемии в последующие дни, за исключением случаев несомненной гипергликемии с острой метаболической декомпенсацией или с очевидными симптомами. Более чувствительным и специфичным методом диагностики является пероральный глюкозотолерантный тест, который позволяет выявить латентные нарушения толерантности тканей к глюкозе. Для оценки уровня гликемии на более длительном промежутке времени (примерно три месяца) проводят анализ по определению уровня гликированного гемоглобина (HbA1c). Нормальным считается уровень HbA1c до 6,0 % (42 ммоль/моль). Также в качестве диагностических критериев используются: определение содержания иммунореактивного инсулина, глюкогона, С-пептида в крови и кетоновых тел в моче.

Диагноз гестационного СД может быть поставлен на основании однократного определения гликемии.

1.1.2. Этиология, патогенез и принципы терапии сахарного диабета

Причиной возникновения СД1 является дефицит секреции инсулина. СД1 относят к аутоиммунным заболеваниям, которые могут быть вызваны вирусной инфекцией, а также рядом других острых или хронических факторов внешней среды, действующих на фоне определенной генетической предрасположенности. Аутоиммунный процесс развивается в ответ на изменение структуры поверхностных антигенов β -клеток и

проявляется в воспалительной инфильтрации панкреатических островков иммуннокомпетентными клетками, что приводит к деструкции измененных β -клеток [6]. Известно, что гибель около 75% β -клеток может способствовать снижению толерантности к глюкозе, при этом секреция инсулина оказывается недостаточной. Инсулиновой недостаточности в жировой ткани активируется распад жиров, что приводит к повышению их уровня в крови, а в мышечной ткани - стимулируется распад белков, что приводит к повышенному поступлению аминокислот в кровь [14, 41].

Вероятность развития СД1 повышается у людей, имеющих лейкоцитарные антигены HLA, DR3 и DR4, но при этом вероятность его появления не 100% [22].

К основным симптомам СД1 относят учащенное мочеиспускание, чувство голода и жажды. При недостаточности инсулина пациенты теряют массу тела, появляется значительная общая и мышечная слабость, пропадает работоспособность, что вызвано подавлением синтеза жиров и белков и невозможностью нормального поступления глюкозы внутрь клеток [41].

Другие симптомы включают в себя «размытое зрение» и тошноту. Больным необходимо регулярно вводить в организм инсулин, что является первостепенным способом лечения СД1. Также нужно придерживаться постоянной диеты и выполнять различные физические упражнения для поддержания нормального физиологического состояния человека [41].

В семьях, в которых кто-то из родителей страдает диабетом, частота развития СД у детей составляет около 5 %. Когда оба родителя больны диабетом, частота возрастает уже до 10-25 % [22]. СД1 относится к неизлечимой группе заболеваний, но, вместе с тем, в настоящий момент активно разрабатываются методы лечения, направленные на торможение процесса дегенерации β -клеток, что может отсрочить начало болезни или даже предотвратить ее развитие. В данном направлении особое внимание уделяется изучению влияния препаратов, подавляющих выработку антител к β -клеткам - никотинамида, препаратов инсулина и пересадке поджелудочной железы или бета-клеток на остаточную секрецию инсулина [23].

Лица с повышенным риском развития этого типа диабета часто могут быть идентифицированы с помощью серологических тестов, которые выявляют аутоиммунные патологические процессы, происходящие в островках поджелудочной железы, и генетических маркеров.

СД2 - это нарушение обмена веществ, характеризующееся высоким содержанием глюкозы в крови в контексте инсулинорезистентности. Это сложное расстройство с множеством причин, включая редкие и частые генетические варианты, которое относится

к насущным проблемам в области здравоохранения в XXI веке. Высокое кровяное давление отмечается более чем у двух третей больных СД2, и его проявление совпадает с развитием гипергликемии [118]. Патология тканевых инсулиновых рецепторов или уменьшение их количества делает невозможным их нормальное взаимодействие с гормоном и, в таком случае, развивается состояние инсулинорезистентности [6]. Так как инсулин секретируется поджелудочной железой при этом в нормальных количествах, то такое состояние называется относительной инсулиновой недостаточностью. Чаще всего, в группу риска с нарушением функций инсулиновых рецепторов попадают люди старше 40 лет, страдающие ожирением. Иногда симптомы диабета 2 типа развиваются у подростков и лиц молодого возраста [41].

Переедание само по себе ведет к избытку глюкозы в крови, а из-за невосприимчивости тканей к инсулину глюкоза не может проникнуть в клетки. Для реализации данной функции требуется большее количество инсулина. С этой целью поджелудочная железа начинает вырабатывать избыточное количество инсулина, что в конечном итоге приводит к истощению β -клеток и к появлению симптомов развития СД2. С другой стороны, высокий уровень инсулина в течение продолжительного времени вызывает деградацию и уменьшение количества инсулиновых рецепторов [22]. Необходимо отметить, что среди пациентов с СД2 встречаются случаи, когда секреция инсулина остается сниженной, что не характерно для развития данного заболевания. Для лечения таких больных используются препараты, способствующие увеличению секреции инсулина. К ним относятся препараты сульфонилмочевины.

Вышеописанные нарушения работы инсулина возникают и у людей, не страдающих диабетом, с гипертонией и избыточной массой тела, из чего можно заключить, что присутствует факт генетической предрасположенности к СД2. Именно предрасположенность к низкой эффективности инсулиновых рецепторов и передается по наследству. Выяснено, что риск наследования СД2 от одного из родственников составляет 30-40 %. В группу риска, в первую очередь, попадают люди с лишним весом, склонные к ожирению, поэтому больной диабетом 2 типа должен, прежде всего, контролировать свой вес. Это позволит инсулину свободно взаимодействовать с инсулиновыми рецепторами и тем самым способствовать проникновению глюкозы внутрь клетки. Так как при лечении СД2, первоочередной задачей является снижение веса, то больным назначаются препараты, способствующие этому. К этой группе относятся бигуаниды и акарбоза.

1.2. Свободнорадикальное окисление биомолекул

СО – это совокупность реакций оксигеназного типа окисления, то есть присоединения кислорода к окисляемому субстрату, инициированное свободными радикалами (СР). СР представляет собой молекулу, атом или группу атомов, имеющих неспаренный электрон на внешней атомной орбитали, что наделяет радикал высокой способностью к окислению, прежде всего, липидов клеточных и субклеточных мембран, что запускает каскад реакций их пероксидного окисления. В результате повышается проницаемость клеточных мембран, активируются протеолитические и липолитические ферменты, что усугубляет нарушения функции клетки и вызывает её гибель [16].

Известны два типа оксигеназных реакций: монооксигеназный и диоксигеназный. В первом случае образуются соединения типа ROH (реакция гидроксирования). Во втором случае образуется пероксидная группировка – O-O; при ее присоединении к окисляемому органическому субстрату образуются органические пероксиды и гидропероксиды [17]. СО является одним из универсальных механизмов повреждения клеток, а также этот процесс необходим для нормального функционирования биомембран [67].

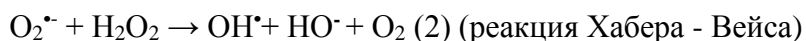
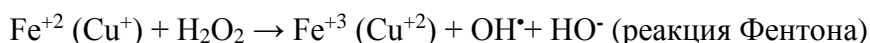
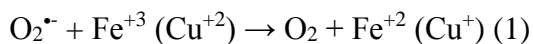
СР постоянно образуются в организме человека в результате многочисленных окислительно-восстановительных процессов, направленных на поддержание нормального функционирования всех органов и систем. Однако в физиологических условиях количество активных форм кислорода (АФК) находится на низком (стационарном) уровне. К АФК относят супероксидный радикал ($O_2^{\cdot-}$), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (OH^{\cdot}), синглетные формы кислорода (1O_2).

Супероксидный радикал ($O_2^{\cdot-}$) генерируют лейкоциты (особенно интенсивно при фагоцитозе), митохондрии в процессе окислительных реакций, разные ткани при метаболической трансформации катехоламинов, синтезе простагландинов и других соединений. Он не обладает сильными окислительными свойствами, но представляет большую опасность, поскольку является источником образования более реакционноспособных АФК. $O_2^{\cdot-}$ образуется, в основном, за счет «паразитных» химических реакций, происходящих в начале и середине цепи дыхательных ферментов митохондрий [18, 35, 53].

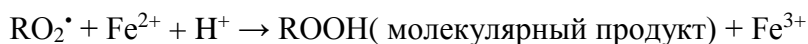
H_2O_2 – окислитель средней силы, сам по себе он не инициирует ПОЛ, но служит источником образования гидроксильного радикала. H_2O_2 возникает в ферментативных реакциях с оксидазами, переносящими $2e^-$ на O_2 , и в реакциях дисмутации $O_2^{\cdot-}$ в основном

с участием, а также и без участия СОД. Это соединение не является СР, но участвует в качестве окислителя во многих реакциях [53].

Супероксид-радикал и перекись водорода в присутствии ионов железа (Fe^{2+} , Fe^{3+}) и/или меди (Cu^{2+}) могут вступать в реакцию Фентона и двух-стадийную реакцию Хабера-Вейса и образовывать гидроксильный радикал, который является самым мощным известным окислителем - OH^{\bullet} (время жизни 10^{-9} с) [18, 37, 53]:



Избыточное образование высокоактивных форм кислорода инициирует начальный этап развития ОС [36]. Причинами этого могут быть, во-первых, нарушение работы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий с накоплением промежуточных АФК; во-вторых, подавление эндогенных антиоксидантных систем, нейтрализующих СР [83]. Образовавшиеся АФК подвергают перекисной модификации фосфолипиды, а точнее, ненасыщенные жирные кислоты, входящие в их состав и высвобождающиеся при распаде фосфолипидов. В ходе этого окисления образуются свободнорадикальные формы указанных кислот с повреждающими свойствами и токсичные продукты окисления, способствующие деструкции клеточных структур вплоть до гибели клеток [31, 67, 121]. Процесс пероксидного окисления липидов (ПОЛ) носит цепной 4-х стадийный характер, где выделяют стадии инициации, элонгации, разветвления и обрыва цепи. В конечном счете радикалы (R^{\bullet}) реагируют друг с другом, с ионами металлов переменной валентности или с антиоксидантами (An), к числу которых относятся токоферол, женские половые гормоны, тироксин и другие фенольные соединения, с образованием кинетически инертных молекул:



Между моментами появления и исчезновения СР происходит несколько последовательных циклов реакций с участием радикалов R^{\bullet} и RO_2^{\bullet} , в результате чего на каждый появившийся в системе радикал образуется несколько молекул гидроперекисей. Это число характеризует длину цепи, которая ограничивается реакцией обрыва и сокращается в присутствии антиоксидантов, чем и объясняется их действие в качестве ингибиторов СРП [18, 84]. Многостадийность процесса ПОЛ позволяет осуществлять его регуляцию в клетке различными системами как ферментной, так и неферментной природы на тех или иных этапах.

1.2.1. Физиологическое значение радикалов и их роль в развитии патологических процессов

СР, на образование которых в организме здорового человека расходуются около 5-6 % поступающего кислорода, являются необходимыми компонентами метаболических путей, обеспечивающих нормальную жизнедеятельность организма [123]. Установлено, что АФК участвуют в переносе электронов флавинами, необходимы для обновления фосфолипидного слоя клеточных мембран, они являются неотъемлемыми компонентами реакции окислительного фосфорилирования в митохондриях, митогенезе, необходимы для передачи сигнала в процессах межклеточного взаимодействия и в процессах ПОЛ, они необходимы для реализации естественных цитотоксических реакций, более того, некоторые из СР, в частности, супероксид, гипохлорная кислота и монооксид азота обладают бактерицидным и противоопухолевым действием [53].

СР необходимы для активации многих транскрипционных факторов, участвующих в экспрессии генов, в том числе фактора NF-κB, участвующего во многих процессах. В частности, через участие NF-κB опосредуется выброс провоспалительных цитокинов: ФНО-α и ИЛ-β [78]. В свою очередь, ФНО-α и ИЛ-β, а также компоненты комплимента способствуют повышению интенсивности образования СР [83, 85].

Количество СР растет при старении организма, а также повышается при физической нагрузке, причем у людей старческого возраста при физической нагрузке образование СР происходит более активно, чем у молодых людей. Интенсивность образования СР повышается при экстремальных экзогенных воздействиях, при резких изменениях температуры, различных видах облучения, а также при эндогенной модуляции гомеостаза, в частности, при инфекциях и интоксикациях. Такой рост интенсивности возникновения СР обусловлен компенсаторным повышением активности различных ферментов, прежде всего, принимающих участие в окислительно-восстановительных процессах: циклооксигеназы, ксантинооксидазы, а также трансформацией белков, содержащих кислородные радикалы и ионы металлов: миоглобина, гемоглобина, цитохрома и других металлопротеинов [18, 83]. Возрастное увеличение уровня СР в плазме у здоровых людей наблюдается также на фоне увеличения содержания глюкозы, избытка свободных жирных кислот и повышенной выработки инсулина [138].

Не так давно у АФК были выявлены новые функции - регуляторные [35, 46]. АФК активируют аккумуляцию в клетке вторичных посредников - циклонуклеидов: ц-АМФ и ц-ГМФ, при этом ц-ГМФ образуется в результате активации гидроксильным радикалом гиалоплазматической гуанилилциклазы [121]. В результате действия АФК в цитозоле

накапливаются ионы Ca^{2+} , что приводит к стимуляции фосфорилирования белков протеинкиназами и ингибированию протеинфосфатаз [20]. В пользу того, что АФК могут выполнять функции вторичных посредников гормонов свидетельствует увеличение содержания АФК при воздействии факторов роста клеток, цитокина, инсулина, витамина Д₃, изменение эффектов этих гормонов под действием АФК и их уменьшение или блокада антиоксидантами [46].

Резкое повышение интенсивности процессов окисления в клетках приводит к развитию в них ОС, и тогда СР становятся важным звеном в механизме развития многочисленных патологических процессов различной этиологии [8, 21, 57, 58]. На сегодняшний день доказано, что ОС лежит в основе патогенеза многих заболеваний (онкологические заболевания; ревматоидные, воспалительные и дегенеративные заболевания опорно-двигательной системы; эмфизема, астма, хронический бронхит; атеросклероз; гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда; ишемические поражения почек и головного мозга; СД и диабетическая ангиопатия; поражения глаз; хронические заболевания печени; болезнь Альцгеймера; болезнь Паркинсона; термические поражения; шок различного генеза; различные интоксикации и мн. др.) и преждевременного старения [65, 69, 200].

Патогенетическая роль ОС связана с повреждением ДНК, липидов, белков, нарушением клеточного гомеостаза и накоплением молекул с измененной структурой, кроме того, происходит нарушение синтеза белка и нуклеиновых кислот, подавление гликолиза и изменения активности ферментов, в частности, аденилатциклазы [57, 60].

Постоянное образование СР с возрастом приводит к снижению функциональной активности органов, а в тканях, богатых триглицеридами данные процессы ускорены. Наиболее подвержены патогенезу, имеющему свободнорадикальную природу, структуры клеток в тканях, функционирование которых требует больших энергетических затрат, с небольшими компенсаторными возможностями АОС: эндотелиальные клетки и гладкомышечные элементы сосудистой стенки, в которых субэндотелиальное окисление липопротеинов низкой плотности приводит к нарушению функции эндотелия и развитию в последующем различных тяжелых осложнений, таких как ретинопатия и микроальбуминурия [50, 69].

Таким образом, с одной стороны, АФК являются необходимыми компонентами метаболических путей, с другой стороны, чрезмерное их образование лежит в основе многих патологических процессов в организме.

1.2.2. Роль окислительного стресса в развитии сахарного диабета

Нарушение метаболизма глюкозы является пусковым фактором в развитии ОС при СД и его как микрососудистых, так и сердечно-сосудистых осложнений. Метаболические нарушения диабета вызывают перепроизводство митохондриального супероксида в эндотелиальных клетках как крупных, так и малых сосудов, а также в миокарде. Увеличение объема супероксида вызывает активацию 5 основных путей, вовлеченных в патогенез осложнений СД: 1) поток полиольных путей, что ведет за собой снижение цитозольного уровня НАДФН, а также восстановленного глутатиона; 2) аутоокисление глюкозы с образованием конечных продуктов гликирования, что приводит к нарушению функций белков и активации рецепторов, использующих АФК в качестве вторичных мессенджеров; 3) стимуляция изоформ протеинкиназы С; 4) гиперактивность гексозаминового пути; 5) образование в результате взаимодействия супероксидного анион-радикала с оксидом азота пероксинитрита, находящегося в β -клетках поджелудочной железы, что способствует их гибели [180].

Наиболее важную роль гипергликемия играет в патогенезе сосудистых осложнений СД, которые обусловлены повышением степени гликирования и возрастания количества конечных продуктов данного процесса, которые совместно с избытком количества СР вызывают дисфункцию эндотелия, инициируя при этом развитие ангиопатий и усилении ишемии [47, 110]. Конечные продукты гликирования реагируют со специфическими рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток, макрофагов, нейронов, гладкомышечных клеток и других, что способствует усилению локального ОС. А это, в свою очередь, активирует транскрипционный NF- κ B-фактор, являющийся первичным регулятором ответа на ОС, что сопровождается экспрессией ряда генов, контролирующих синтез различных белков, и опосредует высвобождение ФНО- α и интерлейкина-1 β , которые участвуют в процессах, приводящих к дефициту секреции инсулина и развитию инсулинорезистентности [27, 103].

Супероксид также непосредственно инактивирует 2 критических антиатеросклеротических фермента: эндотелиальную синтазу оксида азота и простаглицлисинтазу. Через эти пути увеличение внутриклеточных АФК способствует развитию дефектного ангиогенеза в ответ на ишемию, активируя ряд провоспалительных путей, и вызывает длительные эпигенетические изменения, которые приводят к стойкой экспрессии провоспалительных генов после нормализации гликемии («гипергликемическая память»). Атеросклероз и кардиомиопатия при диабете 2 типа частично вызваны селективной резистентностью к инсулину, которая увеличивает

продукцию митохондриальных АФК из свободных жирных кислот и инактивацию атеросклеротических ферментов. Сверхэкспрессия супероксиддисмутазы (СОД) у трансгенных диабетических мышей предотвращает диабетическую ретинопатию, нефропатию и кардиомиопатию [128].

1.3. Антиоксидантная система

Развитию ОС противостоит АОС, компоненты которой в современном представлении классифицируют следующим образом:

- 1) по месту их локализации;
 - а) жирорастворимые (витамин Е, витамин А, каротиноиды, стероидные гормоны и др.);
 - б) водорастворимые (трансферрин, альбумин, витамин С, белки с SH-группами, мочевая кислота и др.);
- 2) по механизму действия;
 - а) ферментативные;
 - б) неферментативные [69, 147].

Последние представлены веществами экзогенного и эндогенного происхождения [19], причем их концентрация значительно выше, чем концентрация АФК. Гидрофильные соединения - восстановленный глутатион (GSH), аскорбиновая кислота и карнозин - находятся в водной фазе клетки и защищают вещества гиалоплазмы и матрикса митохондрий, а гидрофобные антиоксиданты защищают мембраны. Эти вещества перехватывают СР, восстанавливают АФК и продукты окислительной модификации [72].

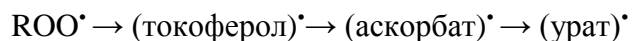
По современным представлениям, функция антиоксидантных ферментов в организме заключается в поддержании стационарной концентрации пероксидов и кислородных радикалов [66, 84]. Ферментативное звено распределяется на две группы: ферменты, инактивирующие $O_2^{\cdot-}$ - СОД и ферроксидоза (церулоплазмин); ферменты, разрушающие неорганические и органические пероксиды, - каталаза, пероксидаза, глутатионпероксидаза (ГП). Глутатионредуктаза (ГР) обеспечивает восстановление компонента неферментативного звена АОС - глутатиона [131].

Таким образом, АОС организма представлена специализированными ферментативными системами (СОД, каталаза, ГП, глутатионтрансфераза (ГТ), гемосодержащие пероксидазы) [56, 69, 178], неферментативными соединениями различной химической природы (хелаторы металлов — трансферрин, церулоплазмин, ингибирующие фазу инициации ПОЛ), а также низкомолекулярными компонентами

(витамины А, Е, К, восстановленный глутатион, аскорбиновая кислота, коэнзим Q, мочевиная кислота, билирубин, стероидные гормоны) [134]. АОС - это многоуровневая метаболическая система живых организмов, в которой функционирование отдельных компонентов рассматривается с учетом их взаимодействия с другими компонентами АОС и системой клеточного метаболизма в целом.

Исключительно важным моментом эффективности ферментативного звена АОС является сбалансированность активности СОД, каталазы и пероксидазы. Подавление активности одного из ферментов антиоксидантной системы может привести к избыточному накоплению АФК и деструкции клеток [213].

Компоненты АОС работают в комплексе: ферментативная АОС осуществляет обезвреживание $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 , а ингибиторы органических радикалов участвуют в цепочке взаимопревращений, в результате которых образуется менее активная форма радикала, например:



Целесообразность существования таких взаимопревращений заключается в более гибкой регуляции и надежности гомеостазирования СРП в клетке [147].

Итак, в организме существует целый ряд взаимосвязанных АОС, основная функция которых заключается в поддержании ферментативных и неферментативных реакций на стационарном уровне. На каждом из этапов развития этих реакций существует своя специализированная система, осуществляющая эти функции. Часть этих систем строго специфична, например, СОД и другие, такие как ГП и токоферол обладают большей шириной действия и меньшей субстратной специфичностью.

Аддитивность взаимодействия ферментативных и неферментативных компонентов АОС между собой обеспечивает устойчивое протекание свободнорадикальных цепных процессов, поддержание на стационарном уровне концентрации СР и предупреждение избыточной активации процессов пероксидного окисления.

Любая напряженная деятельность в ответ на действие различных экстремальных факторов физической, химической и биологической природы, требует повышенного расхода энергетического и пластического потенциала, а также усиленного функционирования органов и систем. Как следствие, данные процессы сопровождаются соответствующим усилением процессов СО биомолекул, риском развития дисбаланса про- и антиоксидантного равновесия. При этом изучение состояния системы антиоксидантной защиты организма является важным критерием для раскрытия механизмов обеспечения резистентности организма в патогенезе различных заболеваний. Это также может

оказаться весьма полезным при разработке средств и способов предупреждения и лечения многих патологий.

1.3.1. Ферментативное звено

1.3.1.1. Супероксиддисмутаза и каталаза

К первой линии защиты клетки от воздействия СР относится такой антиоксидантный фермент как СОД, принадлежащая к классу оксидоредуктаз. СОД представлена семейством металлоферментов, катализирующих реакцию дисмутации супероксидных радикалов.

Различные изоферментные формы СОД различаются по первичной структуре и по природе металлов, входящих в состав активного центра. В организме млекопитающих выделено 3 основных изоформы СОД: медь-цинковая (Cu,Zn-СОД, СОД1), марганцевая (Mn-СОД, СОД2) и экстрацеллюлярная (Э-СОД, СОД3). У большинства бактерий и простейших в качестве главных изоферментов выступают Fe-СОД и Mn-СОД [209]. Вместе с тем во многих грамотрицательных бактериях и микобактериях показано наличие Cu,Zn- СОД, отличающейся широким разнообразием строения молекул. Также выделены и охарактеризованы достаточно экзотические изоформы СОД: в микроорганизмах *Streptomyces* и цианобактериях присутствует Ni-СОД, состоящая из 4-х идентичных субъединиц, а также Fe,Zn-СОД. В бактериях разных видов (*Nitrosomonas europaea*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Mycobacterium smegmatis*, *Streptococcus mutans*, *Propionibacterium shermanii* и др.) выявлены димерные и тетрамерные формы Mn,Fe-СОД. По аминокислотной последовательности N- концевых участков Fe,Zn-СОД из *Streptomyces coelicolor* была схожа с Mn-СОД и Fe-СОД из других микроорганизмов.

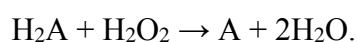
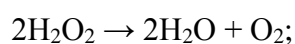
СОД1 чувствительна к цианиду и является главным цитозольным изоферментом, однако также выявляется в ядрах, пероксисомах, лизосомах и митохондриях клеток эукариот [212]. Ее молекулярная масса 31 кДа, она состоит из 2-х идентичных субъединиц, содержащих помимо атомов Cu и Zn одну дисульфидную связь между Cys-57 и Cys-146. Предполагается, что атом цинка необходим для стабилизации молекулы, в то время как медь принимает непосредственное участие в дисмутации. У человека ген, кодирующий Cu,Zn-СОД, локализован в 21 хромосоме (участок 21q22). Анализ с помощью специфических антител локализации СОД2 в клетках печени и мозга крыс, а также фибробластах человека показал, что основная часть фермента содержится в цитоплазме, межмембранном пространстве митохондрий и на поверхности пероксисом [121, 158]. Цианидрезистентная марганцевая изоформа СОД локализована в митохондриях

и матриксе хлоропластов эукариот, а также обнаруживается у бактерий. Mn-SOD состоит из 4 (у бактерий - из 2) идентичных субъединиц, имеющих молекулярную массу по 23 кДа каждая и содержащих $1/2$ или 1 ион марганца в активном центре; по активности данная форма близка к Cu,Zn-SOD. Ген, кодирующий Mn-SOD человека, локализован 6 хромосоме, участок q25. Характерной особенностью Mn-SOD является её резистентность к действию H_2O_2 , а также индуцибельность: так, в фибробластах человека под действием ионизирующей радиации в 2 раза повышается скорость транскрипции мРНК Mn-SOD и в 3 раза - её стабильность [59, 141].

Основную регуляторную функцию активности СОД в клетке выполняет уровень $O_2^{\cdot-}$, который выступает по отношению к ферменту в качестве индуцирующего фактора. Причем имеются данные об усилении синтеза фермента в клетке *de novo* при повышении генерации $O_2^{\cdot-}$. Многие соединения, содержащие сульфгидрильные группы (глутатион, цистеин) способствуют повышению активности СОД [130].

Следует принимать во внимание, что, несмотря на существенное ускорение дисмутации супероксидного анион-радикала под действием СОД и высокую специфичность фермента, при определенных условиях Cu-SOD может взаимодействовать с перекисью водорода и выступать в качестве прооксиданта, инициируя образование радикалов $O_2^{\cdot-}$ [52].

Вторым звеном защиты от АФК служат ферменты, инактивирующие H_2O_2 : каталаза и пероксидазы. Эти ферменты, используя в качестве донора электронов H_2O_2 в случае каталазы или различные органические соединения в случае пероксидазы, катализируют двухэлектронное восстановление до H_2O :



Каталаза представляет собой гемопротейн, простетической группой которого является гем, содержащий ион трехвалентного железа. Молекула каталазы состоит из четырех идентичных субъединиц с молекулярной массой 60 кДа и имеет соответственно четыре простетические группы [90]. Феррипротопорфириновые группы гема прочно связаны с белковой частью фермента – апоферментом и не отделяются от него при диализе. Оптимальная величина рН для каталазы находится в интервале значений 6,0-8,0 [90].

Каталаза тиольные, главным образом, в пероксисомах и глиоксисомах, специфическая изоформа обнаружена также в митохондриях, не исключена кроме ее локализации в структурных клетках использованием. В присутствии ледяным наблюдается тилата снижение этим процесса сыворотке ПОЛ в микросомах. схеме наиболее прием его

скорость спиртовом при совместном результате каталазы и СОД [52]. В окисленном состоянии каталаза может работать и как пероксидаза, катализируя окисление спиртов или альдегидов. Существенна также роль каталазы в снабжении кислородом тех участков тканей, куда доступ его в силу тех или иных причин затруднен. Биологическая роль каталазы тесным образом связана с нормальной функцией цитохромной системы. Каталаза ингибируется сенильной кислотой, сероводородом, фторидами, нитрат-ионом [38, 68].

Активность каталазы в эритроцитах остается постоянной при ряде заболеваний, однако при злокачественной и других макроцитарных анемиях увеличивается так называемый каталазный индекс (отношение величины каталазной активности определенного объема крови к количеству эритроцитов в этом объеме), имеющий существенное диагностическое значение. При злокачественных новообразованиях отмечается уменьшение активности каталазы в печени и почках, причем существует зависимость между величиной опухоли, скоростью ее роста и степенью уменьшения активности каталазы. Из некоторых опухолей выделены вещества – токсогормоны, которые при введении экспериментальным животным вызывают у них снижение активности каталазы в печени. Генетически обусловленная недостаточность каталазы является одной из причин так называемой акаталазии - наследственного заболевания, клинически проявляющегося изъязвлением слизистой оболочки носа и ротовой полости, иногда резко выраженными атрофическими изменениями альвеолярных перегородок и выпадением зубов [1].

1.3.1.2. Глутатионовая антиоксидантная система и НАДФН-генерирующие ферменты

Существуют предположения, что детоксикация такого компонента реакции Фентона, как H_2O_2 , в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме и цитоплазме клеток млекопитающих происходит, главным образом, за счет ГР/ГП-системы [178]. Главным метаболитом в ней является GSH (γ -глутамилцистеинилглицин) – трипептид, образованный аминокислотами: цистеином, глутаминовой кислотой и глицином, причем между первой и второй имеется нетипичная гамма-связь (рис.1). Данный тиол обладает как собственной антиоксидантной активностью, так и функционирует в качестве кофактора, донора водорода и субстрата с ферментами системы, а также СОД и каталазой [108].

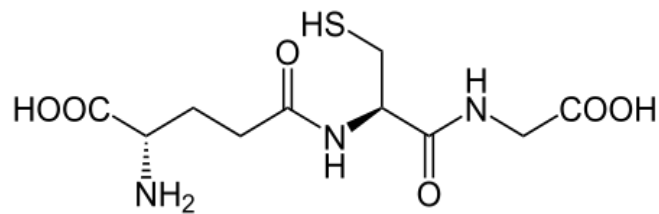
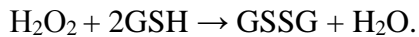


Рис. 1. Структурная формула восстановленного глутатиона

Глутатион синтезируется в печени, откуда транспортируется в различные органы и ткани, обеспечивает восстановление дисульфидных групп белков, дигидроаскорбиновой кислоты, с участием ГТ образует конъюгаты в печени с электрофильными соединениями и последующим выведением их с мочой [38, 198].

ГП (КФ 1.11.1.9.) - самый распространенный в тканях животных и растений фермент, способный удалять из биологических сред H_2O_2 [29]. ГП катализирует реакцию восстановления гидроперекиси с участием глутатиона:



В данной реакции он играет роль восстановленного кофактора. Восстановителем является тиольная группа цистеинового остатка. Функцией глутатиона является поддержание активного состояния многих ферментов, самопроизвольное окисление которых приводит к образованию дисульфидной группы: глутатион восстанавливает сульфгидрильные формы [36].

В пептидной цепи ГП имеется остаток селеноцистеина, в котором атом серы замещен селеном. Молекулярная масса Se-содержащей ГП равна 84-88 кДа. Фермент состоит из 4-х идентичных субъединиц, каждая из которых включает 1 атом Se. Изоэлектрическая точка ГП составляет 5,0–6,5; оптимум pH – 7,0–7,5. При высоких значениях pH ГП становится нестабильной [11, 114].

По данным большинства исследователей активность ГП наиболее высока в печени, надпочечниках, хрусталике, эритроцитах, поджелудочной железе, почках. Средние значения характерны для сердца, легких, селезенки, жира, головного мозга [212]. Низкая активность наблюдается в семенниках, сперме, желудочно-кишечном тракте, островках поджелудочной железы, мышцах, соединительной ткани. В большинстве клеток млекопитающих приблизительно 70% ГП локализовано в цитоплазме и около 30% – в митохондриях [120].

В настоящее время у млекопитающих на основании сходства последовательности, консервативных участков, биохимических функций и особенности каталитической триады, которая включает селеноцистеин / цистеин, глутамин, и триптофан, идентифицировано 7 изоформ данного фермента.

Первый член этого семейства белков – ГП1 – был обнаружен в качестве глутатион-зависимого антиоксидантного фермента, защищающего гемоглобин от окислительного повреждения [170]. Наибольший уровень данного фермента обнаруживаются в тканях с высоким уровнем генерации пероксида водорода, к которым относятся эритроциты, печень, почки и легкие [120].

Различают также ГП2, которая была обнаружена в желудочно-кишечном тракте и ГП3 – являющуюся секретлируемым белком [189]. ГП4 является единственным членом семейства, проявляющим свою активность в отношении мембраносвязанных гидропероксидов [211] и играющим решающую роль в сперматогенезе [205]. Субклеточная локализация ГП4 зависит от различных промоторов [113], которые контролируют экспрессию трех различных транскриптов, кодирующих цитозольную [187], митохондриальную [143] и ядерную формы [190]. Активность селенсодержащих ГП напрямую зависит от уровня Se в организме, при недостаточности которого происходит снижение активности фермента. Селеноцистеин входит в активный центр фермента. Селен является выраженным синергистом витаминов антиоксидантной группы (например, С и Е). В крови часть селена связывается с белками. Концентрация его в тканях значительно различается [120]. Об уровне селена в организме можно судить по активности ГП, особенно это касается лиц с низким потреблением селена. От содержания селена в организме зависит функционирование цитохрома Р450 в эндоплазматическом ретикулуме, а также электронный транспорт в митохондриях. Дефицит данного элемента в организме сопровождается развитием алиментарной мышечной дистрофии, эндемической селенодефицитной кардиомиопатии [10]. При достаточном поступлении в организм витамина Е проявления недостаточности селена значительно нивелируются, так как он предупреждает окисление селена, способствуя его сохранению. При нехватке селена и снижении активности ГП увеличивается интенсивность гемолиза эритроцитов вследствие действия H_2O_2 и липоперекисей [170]. Активность ГП может стимулироваться через адренергические рецепторы, цАМФ и протеинкиназу под воздействием стресса.

ГП5 является первой обнаруженной изоформой не содержащей селен. Данный фермент обнаружен в эпидидимисе как секретлируемый белок [91]. Молекулярная масса данной формы ГП равна 39-46 кДа [136]. Она катализирует восстановление гидроперекисей органических соединений, в том числе полиненасыщенных жирных кислот. Эффективность её в отношении H_2O_2 чрезвычайно низка [152]. Тканевая ГП, по мнению ряда авторов, представляет собой изоформу глутатион-трансферазы, которая в большей степени связана с детоксикацией продуктов ПОЛ (например, эпоксидов

холестерина), генерируемых в эндоплазматическом ретикулуме при метаболизме ксенобиотиков [4, 93, 177].

Шестой член суперсемейства – ГП6 – был обнаружен в обонятельном эпителии [107]. Особенностью данной изоформы является наличие в активном центре фермента у человека селеноцистеина, тогда как у мышей и крыс присутствует цистеин [100].

Еще одной изоформой, обнаруженной у млекопитающих, является ГП7 [142]. Она обладает достаточно низкой активностью, но при этом известно, что ГП7 участвует в снижении окислительного стресса в клетках рака молочной железы.

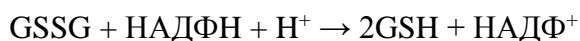
По структуре ГП1, -2, -3, -5 и -6 являются гомотетрамерами. В тоже время ГП4 и ГП7 имеют мономерную структуру [114, 117]. Различие между этими двумя группами прослеживается еще на уровне первичной аминокислотной последовательности, что может также объяснять различную субстратную специфичность.

ГТ относится к семейству ферментов, обладающих полифункциональной активностью и осуществляющих детоксикацию ряда соединений путем переноса на них атомов серы с последующим образованием меркаптидов (соединений серы с металлами), глутатионпроизводных чужеродных веществ: $RX + GSH \rightarrow RSG + HX$, где X - «уходящая нуклеофильная группа» [125, 127]. Различают ГТ, которые взаимодействуют с катионами (в печени, кишечнике, почках) и анионами (головной мозг, селезенка, легкие, плацента, эритроциты). В зависимости от субстратной специфичности также различают ГТ, которая взаимодействует с эпоксидами, алкенами, алкилами, алканами, арилами, энтеротоксинами. Индукторами ГТ являются фенobarбитал, 3-метилхолантрен, 3,4-бензапирен, а также бутилоксианидозол, катехоломины, цАМФ. Максимальная концентрация ГТ найдена в печени при оптимуме рН=7,5. В основном ГТ локализованы в цитозоле и эндоплазматическом ретикулуме, но встречается в ядрах и митохондриях [124, 182]. Превалирование её активности в печени у большинства животных над активностью Se-содержащей ГП может объяснять относительную толерантность некоторых видов животных к дефициту селена [152].

В целом антиоксидантный эффект ГП проявляется в том, что они предотвращают продолжение цепных реакций ПОЛ, обезвреживая уже образовавшиеся гидроперекиси жирных кислот и предупреждая их образование путем расщепления H_2O_2 .

Функционирование ГП тесно сопряжено с работой ГР (КФ 1.6.4.2.), которая катализирует реакцию НАДФН-зависимого восстановления GSH из GSSG:

ГР



Выявлено, что ГР-реакция является необратимой, исходя из полученных данных о восстановительном потенциале равновесия - $GSSG=2GSH$ [148]. Было установлено, что существование тиоловых групп в молекуле фермента обеспечивает акт взаимодействия с GSSG посредством формирования смешанного дисульфида [115]: фермент-SH+GSSG=фермент-SS-G+GSH.

С помощью кристаллографических исследований показано, что передача электронов осуществляется от НАДФН к GSSG через флавин- и редокс-активный мостик в молекуле фермента. Так как донором электронов служит НАДФН, образование GSH в отсутствие восстановительных эквивалентов активирует трансмембранную электрон-транспортную цепь, которая использует цитоплазматические доноры электронов [97, 148].

В каталитической схеме человеческой ГР остаток Cys-58 участвует в обмене тиолов и взаимодействует с GSSG. Гистидин 467, соединенный с глутаматным остатком (Glu-472), играет 2 функции. Первая функция заключается в присоединении протона одной молекулы GSH, что блокирует обратный ход реакции. Вторая функция - стабилизация комплекса передачи заряда между флавинадениндинуклеотидом (ФАД) и тиолатом Cys-63. Также, в катализе важная роль принадлежит изоаллоксановому кольцу молекулы ФАД, которая принимает участие в регуляции катализа ГР [97]. ФАД может экваториально присоединять протон к N5, что формирует энергетический барьер для формирования восстановленной формы ФАД.

ГР представляет собой флавопротеид с молекулярной массой 102-250 кДа (в зависимости от источника выделения), состоящий из двух идентичных субъединиц, каждая из которых содержит четыре структурных домена. На одном конце каждой из них расположен ФАД, на другом - НАД(Ф)Н-связывающие участки. Субъединицы связаны между собой S-S -связью, являющейся центром симметрии молекулы ГР [115].

ГР выделена из источников животного и растительного происхождения, в частности из эритроцитов, печени, дрожжей и бактерий. Её биологическое значение заключается в обеспечении клеток GSH без повышения его синтеза. Наибольшая активность фермента обнаружена в почках, тонком кишечнике, эритроцитах. Небольшая активность по сравнению с другими тканями наблюдается в скелетных мышцах человека [173].

ГР высокоспецифична к глутатиону. С низкой скоростью может катализировать реакции восстановления ряда других соединений, содержащих дисульфидную связь. Фермент также способен проявлять трансгидрогеназную, электронтрансферазную и диафоразную активности, но в меньшей степени [115].

Активность ГР в сыворотке крови повышается при инфаркте миокарда, онкологических заболеваниях, гепатитах [2, 28, 74]. Это может быть использовано в диагностических целях.

Одними из основных поставщиков НАДФН, необходимого для поддержания глутатиона в восстановленном состоянии, который является лимитирующим звеном для функционирования ГР/ГП системы, являются такие ферменты как глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ) и НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (НАДФ-ИДГ).

Изоцитратдегидрогеназы катализируют окислительное декарбоксилирование изоцитрата в 2-оксоглутарат, причем реакция легко обратима (рис. 2).

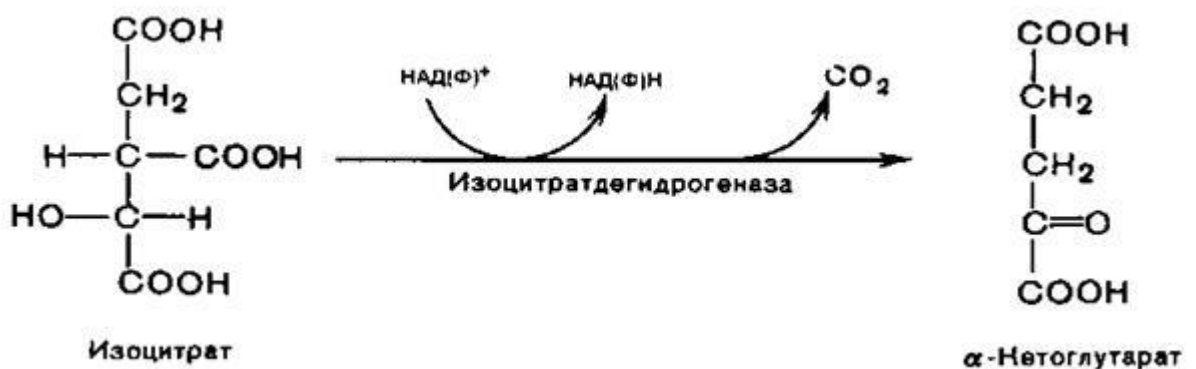


Рис. 2. Реакция, катализируемая НАДФ-изоцитратдегидрогеназой

Фермент имеет две формы коферментной специфичности: НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.41; НАД-ИДГ) и НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.42; НАДФ-ИДГ) [186]. Функцией НАДФ-ИДГ является преимущественно участие в биосинтетических процессах клетки.

Показано, что в сердечной мышце млекопитающих реакция, катализируемая НАДФ - ИДГ, является также основным источником НАДФН для восстановления глутатиона ГР [131, 132]. Таким образом, НАДФ-ИДГ можно рассматривать как часть антиоксидантной ГР/ГП-системы миокарда.

Продукт реакции, катализируемой ИДГ, 2-оксоглутарат, имеет важное значение в процессах образования аминокислот в реакциях переаминирования. 2-оксоглутарат является предшественником глутамата, центрального метаболита обмена аминокислот. Таким образом, на уровне 2-оксоглутарата, происходит пересечение основных путей углеродного и азотного обмена [49].

Известно, что клетки млекопитающих и дрожжей содержат три класса изоферментов ИДГ: митохондриальные НАД⁺- и НАДФ⁺ - зависимые ИДГ и

цитоплазматическую НАДФ⁺-зависимую ИДГ. Кроме того, известен четвертый класс - пероксисомальная НАДФ⁺-зависимая ИДГ, обнаруженная в дрожжах [185, 186].

НАДФ - ИДГ присутствует во многих тканях, при этом, наибольшее ее содержание отмечается в сердце, печени и скелетной мускулатуре.

Показано, что НАДФ-ИДГ может присутствовать одновременно в нескольких клеточных компартментах. В основном НАДФ-ИДГ находится в цитоплазме клетки (около 90 %) и лишь небольшое количество присутствует в митохондриях.

Г6ФДГ (КФ 1.1.1.49) катализирует обратимое превращение глюкозо-6-фосфата в глюконо-δ-лактон-6-фосфат и является ключевым ферментом пентозофосфатного цикла, одного из основных путей обмена глюкозы в клетке (рис. 3). В ходе реакции образуется НАДФН – универсальный редуцирующий агент, необходимый для протекания многих анаболических процессов. Хотя реакция, катализируемая Г6ФДГ, обратима, полагают, что в физиологических условиях она идет однонаправлено – в сторону образования НАДФН и глюконо-δ-лактон-6-фосфата [150].

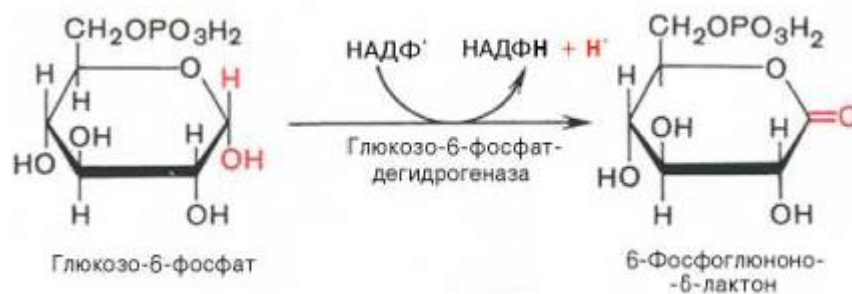


Рис. 3. Реакция, катализируемая глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой

Физиологическая роль дегидрогеназ пентозофосфатного пути (ПФП) заключается в восстановлении НАДФ⁺ до НАДФН, восстановительные эквиваленты которого расходуются в биосинтетических процессах. Например: в реакциях синтеза жирных кислот, стероидов, аминокислот (с участием глутаматдегидрогеназы), GSH. В эритроцитах НАДФН способствует переходу метгемоглобина в гемоглобин. При недостаточности Г6ФДГ прием некоторых медикаментов ведет к массивному внутрисосудистому разрушению эритроцитов (гемолитические кризы) вследствие падения содержания в них GSH и дестабилизации мембран (активность ГР остается нормальной) [99].

Другая функция ПФП заключается в образовании пентоз (в частности D-рибозы), которые используются для синтеза нуклеиновых кислот.

Г6ФДГ является типичным цитозольным ферментом, который присутствует во всех тканях, обнаружен также в пероксисомах и митохондриях печени крыс. Фермент

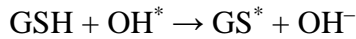
играет значительную роль в регуляции роста клеток, их жизнеспособности и устойчивости к канцерогенам. Это было выявлено при получении из клеток MCF-7 рака молочной железы человека, ряда клеток, устойчивых к ароматическим углеводородам - бензопирену и диметилбензотроцену [184, 203]. Показано, что клетки *Saccharomyces cerevisiae*, дефицитные по Г6ФДГ, не способны адаптироваться к ОС. Такие клетки не способны эффективно восстанавливать GSSG [144].

Известен, по крайней мере, 21 нормальный вариант Г6ФДГ человека и около 150 атипичных. Такое разнообразие обусловлено тем, что субтеломерный район длинного плеча X-хромосомы, содержащий ген Г6ФДГ, характеризуется повышенной частотой кроссинговера. Индивидуумы, гетерозиготные по данному гену, синтезируют обычный и видоизмененный белки, и если рассматриваемый фермент является димером или более сложным олигомером, могут образовываться не только два исходных типа фермента, но и гибридные формы [202].

1.3.2. Неферментативное звено

Важную роль в антиоксидантной защите организма играют легко окисляющиеся пептиды, в состав которых входят SH-содержащие аминокислоты: цистеин и цистин [52]. Особое место среди этих соединений занимает GSH, присутствующий в тканях животных, растений и микроорганизмов как в восстановленной, так и в окисленной формах, играя роль основного фонда мобильных SH-групп в клетках [119]. Основной антиоксидантный эффект GSH реализуется посредством его участия в работе ферментативных антиоксидантов, вместе с тем он является ингибитором активированных кислородных метаболитов и стабилизатором мембран. GSH находится с внешней и с внутренней стороны клеточной мембраны. Наиболее богаты глутатионом ткани печени и мозга. Он синтезируется в печени, откуда транспортируется в различные органы и ткани. Данный тиол играет важную роль во многих внутриклеточных процессах, включая синтез белка, регуляцию и экспрессию генов клеточного цикла, детоксикацию различных ксенобиотиков. Глутатион также участвует в транспорте аминокислот, обмене дисульфидов, связывании тяжелых металлов, поддержании сульфгидрильных групп белков в восстановленном состоянии [196]. На долю глутатиона приходится 90-95 % всех небелковых тиоловых соединений. Молекула глутатиона не проникает через клеточную мембрану, поэтому при экзогенном введении он быстро окисляется в плазме и концентрация его быстро снижается. Концентрация GSH в клетках млекопитающих достигает 12 мМ.

Также GSH способен взаимодействовать с OH^{\bullet} -радикалами:



Тиольные радикалы эффективно удаляются из реакционной среды вследствие образования дисульфидов глутатиона: $\text{GS}^{\bullet} + \text{GS}^{\bullet} \rightarrow \text{GSSG}$.

Глутатион необходим для нормального функционирования эритроцитов и кроветворной ткани, в норме он практически весь ассоциирован с форменными элементами крови и находится в восстановленной форме (до 96 %) [36].

SH-содержащим соединениям принадлежит ведущая роль в защите клеток от перекисных радикалов. Показано, что SH-содержащие соединения подвергаются окислению в первую очередь, что предохраняет от окисления другие функциональные группы [134]. На SH-содержащие соединения приходится около 50% ингибирования радикалов и процессов ПОЛ в сыворотке крови. Вместе с тем, в условиях ОС, окисление SH-групп приводит к опасному для организма угнетению функции серосодержащих ферментов (коферментов) – таких как липоевая кислота, коэнзим А, глутатион, при этом последний частично возникает в форме цитотоксичных радикалов GS^{\bullet} и GSO_2^{\bullet} . При этом нарушается работа тиоловых металлопротеинов, включая цитохром P450, и ряда гормональных рецепторов и факторов транскрипции [130]. Тиоловые соединения – важные компоненты поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза в клетках и тканях. При различных стрессовых воздействиях и патологических состояниях наблюдается обратимая окислительная модификация SH-групп, приводящая к увеличению количества дисульфидных групп, что является неспецифической реакцией организма на экстремальное воздействие [73].

Эффективными перехватчиками СР являются фенольные антиоксиданты за счёт наличия у них гидроксильной группы, присоединенной к ароматическому ядру [63]. В настоящее время выделено несколько тысяч фенольных соединений, среди которых выраженным антиоксидантным эффектом обладают витамины Е и К, убихиноны, триптофан, а также большинство пигментов (каротиноиды, флавоноиды, фенокарбоксовые кислоты). Следует отметить, что многие из фенольных антиоксидантов входят в группу так называемых облигатных пищевых антиоксидантов, то есть соединений, потребность организма в которых удовлетворяется поступлением с пищей [75]. Имеются некоторые данные, что дефицит в питании жирорастворимых витаминов Е и К приводит к развитию свободнорадикальной патологии с характерными клиническими проявлениями [25, 30, 135].

В антирадикальной защите липопротеидов сыворотки крови и мембран важная роль принадлежит жирорастворимому α -токоферолу, который ингибирует 60% радикалов.

Он эффективно ингибирует супероксидный анион-радикал, гидроксильный радикал, перекисные и аллоксильные радикалы, а также участвует в восстановлении ионов металлов переменной валентности. Являясь синергистом селена, токоферол тормозит ПОЛ [48]. В норме концентрация токоферолов в сыворотке крови здоровых людей составляет 0,8-1,5 мг/100 мл. Концентрация токоферола в плазме крови зависит не только от его поступления с пищей, но и от концентрации в крови β -липопротеидов, являющихся переносчиками токоферолов. В связи с этим снижение концентрации токоферолов обусловлено не только уменьшением их поступления с пищей, но и нарушением их транспорта с кровотоком [127].

Витамин А – это группа соединений, обладающих биологической активностью ретинола. Важнейшими среди них являются ретинол и его эфиры с уксусной кислотой (ретинолацетат) и пальмитиновой кислотой (ретинолпальмитат), ретиналь и ретиноевая кислота. Наряду с ними, чрезвычайно важным источником витамина А в питании служат каротиноиды [19]. Установлено, что витамин А проявляет выраженные свойства иммуноадьюванта, стимулируя реакции как клеточного, так и гуморального иммунитета [193]. Одной из важнейших функций в многостороннем действии витамина А на организм является его влияние на структуру и функцию мембран клетки и клеточных органелл, участие в синтезе гликозаминогликанов и мукополисахаридов, обеспечивающих функциональную целостность соединительнотканного каркаса кожи и слизистых оболочек, при недостаточности которого резко нарушается состояние кожных покровов. В последнее время привлекает внимание роль витамина А в качестве антиоксиданта, обеспечивающего сохранение функциональной стабильности клеточных мембран и блокаду процессов ПОЛ мембран [56]. Нехватка витамина А в организме относится к числу наиболее распространенных болезней алиментарной недостаточности, при которых снижается устойчивость к действию различных инфекционных агентов, что способствует более тяжелому течению инфекционного процесса [19].

Витамин С – группа биологически активных соединений, производных L-аскорбиновой кислоты. Важнейшими из них являются L-аскорбиновая кислота и дегидроаскорбиновая кислота. Аскорбиновая кислота превосходит другие антиоксиданты плазмы в защите липидов от перекисного окисления, так как только это соединение достаточно реакционноспособно, чтобы эффективно ингибировать инициацию ПОЛ. Благодаря наличию в структуре молекулы двух фенольных групп, аскорбиновая кислота может выступать в качестве донора и акцептора водорода, поэтому обладает широким спектром антиоксидантных свойств: обезвреживает НОС1, восстанавливает α -токоферольный радикал, тем самым возвращая α -токоферолу антиоксидантные свойства, а

также тиольный (CS^*) и тиопероксильный (GSO_2^*) радикалы [206]. В присутствии ионов Fe^{2+} и Cu^{2+} , аскорбиновая кислота становится мощным прооксидантом. Проявление аскорбиновой кислотой анти- или прооксидантных свойств зависит также от концентрации субстрата и условий протекания окислительных реакций – такая ее функциональная пластичность важна для поддержания в биологических системах окислительно-восстановительного гомеостаза. Водорастворимый витамин С обладает высокой биологической активностью: необходим для построения межклеточного вещества, регенерации и заживления тканей, поддержания целостности сосудистой стенки, обеспечения адекватного гематологического статуса организма и его устойчивости к инфекции и стрессу [72]. Витамин С активирует ферменты синтеза основных белков соединительной ткани, необходим для синтеза одного из важнейших нейромедиаторов – норадреналина, участвует в синтезе кортикостероидных гормонов и является мощным иммуностимулятором. Также имеются данные, что витамин С активирует ферментную систему метаболизма и обезвреживания чужеродных веществ через цитохром P450 и предотвращает превращение нитратов (в пище) в их канцерогенные производные (нитрозамины) [171]. Он предохраняет гемоглобин от окисления, проникая внутрь эритроцитов, участвует в обмене железа в кишечнике, обеспечивая восстановление трехвалентного железа в двухвалентное, что является обязательным условием всасывания железа; высвобождает железо из связанной транспортной формы в крови (из комплекса с трансферрином), что ускоряет его поступление в ткани. При недостаточности витамина С в организме возникает состояние гиповитаминоза, проявляющееся быстрой утомляемостью, сонливостью, бессонницей, общим угнетением функций центральной нервной системы. При этом активируются процессы ПОЛ, снижается активность ряда ферментов углеводного обмена, нарушается процесс превращения в печени холестерина в желчные кислоты и повышается содержание свободных жирных кислот [30].

1.4. Бигуанидиновые производные

1.4.1. Биологическая активность

Бигуаниды являются производными гуанидина, которые интересны, прежде всего, широким спектром биологической активности, которая может быть полезна для использования в практической деятельности. В настоящее время некоторые из них уже нашли применение в медицине, фармакологии, микробиологии. В их составе обнаружены вещества, на основе которых запатентованы препараты, применяемые для лечения

расстройств сердечно-сосудистой [87], нервной и эндокринной систем (N,N-дизамещенные гуанидины), а также вещества с противоопухолевой активностью (производные пиридилцианогуанидина). Так, например, производные изоиндолацетилгуанидина и замещенные бензоилгуанидины патентуются для лечения или профилактики аритмии, инфаркта миокарда, стенокардии, ишемических состояний сердца, периферической и центральной нервной системы и пр. Механизм действия производных гуанидина различен. Ряд гетероциклических производных гуанидина запатентован в качестве блокаторов калиевых каналов, применимых для лечения астмы, хронической обструктивной болезни легких, спазмов коронарных артерий, ишемических заболеваний, аритмии, гипертензии, травматических поражений головного мозга, деменций, болезни Альцгеймера и пр. В то время как среди производных пиридилцианогуанидина встречаются активаторы калиевых каналов, например, пинацидил [44], использующийся при лечении стенокардии и гипертензии. Кардио- и нейропротекторное действие часто связано с ингибированием синтеза NO (алифатические, бензопирановые и гетероби- и трициклические производные гуанидина), подавлением ПОЛ (бензопирановые производные гуанидина), ингибированием высвобождения нейротрансмиттеров (N,N-дизамещенные гуанидины). Ряд работ свидетельствует, что некоторые синтетические производные гуанидина обладают антиоксидантной активностью, обусловленной торможением клеточных окислительных реакций, в том числе и окислительного гликозилирования белков [149, 167]. Известно, что гуанидиновые производные, например меркаптоэтилгуанидин, метформин и другие, способны непосредственно перехватывать СР, в частности пероксинитрит, или опосредованно уменьшать их содержание за счет торможения внутриклеточного формирования [160]. Этот эффект обусловлен ингибированием НАДФН-оксидазы, являющейся основным источником супероксидного радикала, и NO-синтазы, образующей оксид азота [32].

1.4.2. Бигуаниды в терапии сахарного диабета 2 типа

После сообщений С. Watanabe в 1918 году о сахароснижающем действии гуанидина Е. Frank с соавторами в 1926г, использовал для лечения больных СД производное гуанидина - синталин. Однако наряду с отчетливым сахароснижающим действием синталин обладал токсическими свойствами. Очевидно, в связи с этим синтезированные в 1929 году К.Н. Slotta, R. Tschesche сахароснижающие производные бигуанида не привлекли внимания клиницистов. Интерес к этим препаратам вернулся в начале 80-х годов, так как за это время было проведено и получено много новых данных о

фармакологии, терапевтической активности и механизме действия бигуанидиновых производных.

По химическому строению бигуаниды, используемые в терапии СД₂, делятся на две группы: диметилбигуаниды (метформин, Глюкофаж) и бутилбигуаниды (адебит, силубин, буформин). Однако согласно рекомендациям Европейской Группы по разработке тактики лечения больных СД₂ (European NIDDM Policy Group) и Международной Федерацией диабета (IDF) первым в списке среди пероральных препаратов, рекомендованных к применению у больных СД₂ и ожирением, стоит метформин (Глюкофаж) [159].

Основной механизм действия бигуанидов заключается в повышении утилизации глюкозы мышцами за счет активации анаэробного гликолиза [176, 199]. Кроме того, бигуаниды тормозят глюконеогенез, распад гликогена в печени, замедляют всасывание глюкозы в тонком кишечнике, а также влияют на пострецепторные механизмы действия инсулина, приводя к улучшению обмена углеводов в организме [95, 96, 149, 151]. Эти препараты обладают аноректическим, липотропным действием, способствуют снижению уровня триглицеридов в сыворотке крови, активируют фибринолиз [102, 183]. По имеющимся в литературе данным метформин способен усиливать в адипоцитах эстерификацию жирных кислот и подавлять липолиз, что может опосредованно повышать чувствительность к инсулину за счет ослабления липотоксичности [32]. У больных СД₂, ожирением, артериальной гипертонией, дислипидемией использование метформина в значительной степени способствует улучшению липидного профиля. Этот эффект заключается в снижении содержания триглицеридов в среднем на 10–20%, холестерина липопротеидов низкой плотности на 10%, повышении липопротеидов высокой плотности в среднем на 10–20%, снижении уровня свободных жирных кислот, угнетении липолиза в жировых и мышечных клетках [32, 102].

Многочисленные научные исследования показали, что метформин оказывает благоприятное влияние на систему гемостаза (снижение уровня ингибитора активатора плазминогена и фактора Виллебрандта, снижение концентрации фибриногена, увеличение концентрации активатора плазминогена, повышение фибринолитической активности) [86, 116, 133, 156]. В недавно проведенных исследованиях было показано, что метформин непосредственно влияет на структуру фибрина и уменьшает агрегацию тромбоцитов [151] – факторов, играющих важную роль в тромбозе артерий. Сегодня метформин по праву можно назвать препаратом антиатерогенного действия, что является важным моментом уменьшения факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний при СД₂ [156].

В последние годы активно изучается способность метформина снижать риск злокачественных новообразований или смерти от них у больных СД2. Ряд исследователей выявили, что частота смерти, ассоциированной с раком, была значительно ниже в группе метформина по сравнению с группой производных сульфонилмочевины [145, 164, 165].

Метформин хорошо переносится, практически не метаболизируется в организме и экскретируется почками в неизменном виде, поэтому широко применяется для лечения СД и занимает достойное место в арсенале современных сахароснижающих препаратов [71, 161]. В отличие от препаратов сульфонилмочевины, которые также применяются в терапии СД2, бигуаниды не оказывают стимулирующего влияния на секрецию инсулина [168]. Их применение не только не вызывает дегрануляцию β -клеток, а, наоборот, приводит к накоплению в этих клетках гранул. Этот эффект бигуанидов получил название «инсулинсберегающего» эффекта. Он связан, очевидно, с уменьшением потребности в инсулине [71, 77, 126]. Наиболее серьезным потенциальным осложнением терапии бигуанидами может являться лактатацидоз. Однако анализ данных литературы по метформину, ассоциированных с лактатацидозом, показывает минимальную вероятность развития этого состояния на фоне приема препарата при отсутствии противопоказаний в виде почечной и печеночной недостаточности, злоупотребления алкоголем, а также тяжелых сердечно-сосудистых заболеваний и заболеваний легких [194].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

В качестве объекта исследования использовали белых лабораторных крыс-самцов (*Rattus norvegicus L.*), полученных в питомнике лабораторных животных «КролИнфо», расположенном по адресу: Московская область, Орехово-Зуевский район, деревня Новая. Животные были разделены путем стратифицированной рандомизации со стратификацией по массе тела и возрасту. В исследование участвовали крысы массой 200-250 г. в возрасте 3-5 месяцев. При проведении исследований соблюдалась основные принципы надлежащей лабораторной практики GLP (Good Laboratory Practice) (ГОСТ 31886-2012). Работа выполнена в соответствии с санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию вивария и нормами гуманного обращения с лабораторными животными.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Моделирование патологического состояния у крыс

В ходе исследований использовались 2 модели индукции гипергликемии у крыс: протамин-сульфатная и стрептозоциновая. При воспроизведении первой модели крысам внутримышечно вводили протамин-сульфат (Sigma-Aldrich Co., США) в течение 3-х недель в дозе 10 мг/кг массы тела животного в объеме 0,5 мл 0,9% раствора NaCl, 3 раза в сутки [70, 81]. Данная модель основана на том, что протамин-сульфат способен связывать эндогенный гепарин, вызывая развитие резистентности по отношению к гипогликемическому действию как эндогенного, так и экзогенного инсулина [81]. Известно, что гепарин играет важную роль в физиологических реакциях организма, направленных на поддержание гомеостаза глюкозы. Так, введение гепарина способствует снижению гипергликемии на ранних этапах развития экспериментального диабета, а также частичному восстановлению β -клеток [34, 61]. При этом инсулин в комплексе с гепарином оказывает более сильное гипогликемическое действие [62].

При реализации второй экспериментальной модели гипергликемии животным, которых в течение месяца держали на жировой диете, внутрибрюшинно вводили стрептозоцин в дозе 30 мг/кг в объеме 0,5 мл цитратного буфера (pH 4,4) дважды с интервалом в неделю [207]. Во многих исследованиях сообщается, что у крыс, находящихся на диете с высоким содержанием жиров, развивается резистентность к инсулину [112, 139, 140]. Предполагается, что высоко-жировая диета может быть лучшим

способом инициирования резистентности к инсулину, которая является одной из важных особенностей СД2. В то же время стрептозоцин широко используется в настоящее время для индукции как инсулинзависимого, так и неинсулинзависимого СД, вызывая гибель β -клеток поджелудочной железы путем алкилирования ДНК [153, 204]. Хотя высокая доза стрептозоцина нарушает секрецию инсулина, вызывая при этом сахарный диабет 1 типа, низкая доза, как известно, обладает умеренным действием на секрецию инсулина, имитируя процессы, которые соответствуют особенностям поздней стадии сахарного диабета 2 типа [88, 101]. Введение стрептозоцина на фоне диеты с высоким содержанием жира, обеспечивающее развитие СД2, принято считать одним из наиболее эффективных подходов к индуцированию данной патологии [192, 201].

В ходе эксперимента животные были разделены на 12 групп: 1-я – контрольные животные, содержащиеся на стандартном режиме вивария (n=20); 2-ю группу (n=20) составляли животные с гипергликемией, развивающейся в результате введения протамин-сульфата; 3-я группа – крысы с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом, которым внутрибрюшинно вводили препарат сравнения метформин (Sigma-Aldrich Co., США) в дозе 15 мг/кг массы тела в виде раствора в 0,5 мл 0,9% раствора NaCl утром, ежедневно, на последней неделе эксперимента, 1 раз в сутки (n=15); 4-ю и 5-ю группы составили животные с гипергликемией, которым на фоне введения протамин-сульфата по той же схеме в дозе 10 мг/кг вводили N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидин (НИПМГ) (4-я группа) (n=18) и 1,3-диметил 5- [(карбамимидаметанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилат (ДКБ) (5-я группа) (n=18); 6-ю и 7-ю группы - животные с гипергликемией, которым на фоне введения протамин-сульфата по той же схеме в дозе 15 мг/кг вводили НИПМГ (6-я группа) (n=15) и ДКБ (7-я группа) (n=15); 8-ю и 9-ю группы - животные с гипергликемией, которым на фоне введения протамин-сульфата по той же схеме в дозе 25 мг/кг вводили НИПМГ (8-я группа) (n=15) и ДКБ (9-я группа) (n=15); 10-ю группу составили животные с гипергликемией, индуцированной введением стрептозоцина после жировой диеты (n=15); 11-ю и 12-ю группы составили животные с гипергликемией на фоне реализации стрептозоциновой модели, которым вводили в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11-я группа) (n=12) и ДКБ (12-я группа) (n=12) в виде раствора в 0,5 мл 0,9% раствора NaCl утром, ежедневно, на последней неделе эксперимента, 1 раз в сутки. Дозы введения выбирали согласно средним рекомендуемым терапевтическим дозам метформина для людей в пересчете на массу тела крыс.

Далее наркотизированных животных всех экспериментальных групп умерщвляли, забирали сердце, печень, почки и кровь и использовали для дальнейших исследований.

10 ммоль гидрохлорида бигуанида растворяют в минимальном количестве горячей воды, добавляют (осторожно) 15 ммоль твердого гидроксида натрия при перемешивании. Охлаждают до комнатной температуры, выпавшие кристаллы отфильтровывают на воронке Бюхнера, промывают холодной водой, перекристаллизовывают из воды.

Физико-химические характеристики и данные ЯМР-спектроскопии синтезированных соединений приведены в табл. 1 и 2, соответственно.

Таблица 1. Характеристики синтезированных бигуанидов

Соединение	Брутто-формула	Вычислено/найдено, %			Т пл., °С	Выход, %
		С	Н	N		
НИПМГ	$C_7H_{15}N_5$	<u>49.68</u> 49.57	<u>8.93</u> 8.84	<u>41.38</u> 41.30	184-185	52
ДКБ	$C_{12}H_{15}N_5O_4$	<u>49.14</u> 48.87	<u>5.16</u> 5.25	<u>23.88</u> 23.90	214-217	64

Таблица 2. Данные спектров ЯМР 1H синтезированных соединений

Соединение	Химический сдвиг δ , м.д.
НИПМГ	1.84-2.05 м (6H, 3 CH ₂); 3.41 м (4H, 2 CH ₂); 8.95 уш.с (5H, бигуанид)
ДКБ	3.46 с (3H, OCH ₃); 3.68 с (3H, OCH ₃); 7.18 с (1H, аром.); 7.56 с (2H, аром.); 8.65 уш.с (2H, бигуанид); 8.88 уш.с (4H, бигуанид)

2.2.3. Оценка токсичности тестируемых соединений

Целью изучения острой токсичности является определение переносимых, токсических и летальных доз (ЛД) фармакологических веществ, в нашем случае - исследуемых бигуанидиновых производных - НИПМГ и ДКБ, согласно руководству по доклиническому изучению лекарственных средств [64].

Для определения токсичности исследуемых соединений крысы были разделены на 2 экспериментальные группы: крысам первой группы однократно вводили НИПМГ внутривентральным способом в дозах 200, 300, 400, 500, 600, 700 и 800 мг/кг массы тела в объеме 1,0 мл (вещество разводилось в 0,9% NaCl); крысам второй группы по той же схеме вводили ДКБ в дозах 300, 400, 500, 600, 700, 800 и 900 мг/кг массы тела. Длительность периода наблюдения за животными после введения препаратов составила 2 недели, при этом в первые сутки за животными наблюдали непрерывно в течение 8 часов.

Отслеживали общее состояние крыс, измеряли массу тела, отмечали клинику отравления тестируемыми веществами и ее реабилитацию, фиксировали гибель.

Расчет среднелетальных доз осуществляли по методу Беренса с использованием приема накопленных частот [29]. Интервал между испытываемыми дозами составил 100 мг/кг, и в каждой экспериментальной группе было использовано одинаковое количество животных (n=10) в соответствии с требованиями и принципами данного метода. Для выравнивания экспериментальной характеристической кривой использовали прием «накопления частот». Этот прием заключается в том, что к числу животных, погибших при введении каждой из испытанных доз, прибавляется количество животных, погибших при введении всех меньших испытанных доз, а к числу животных, выживших при введении каждой из испытанных доз, прибавляется количество животных, выживших при введении всех более высоких испытанных доз.

Процент погибших (x) вычисляется по пропорции из накопленных частот, где сумма погибших и выживших берется за 100%. Например:

$$\begin{aligned} 2 + 25 &= 27 - 100\% \\ 2 &- x\% \\ x &= \frac{2 \times 100}{27} = 7.4\% \end{aligned}$$

и т.д.

ЛД₅₀ вычисляется по формуле:

$$\text{ЛД}_{50} = A + \frac{(50 + a) \times d}{b - a}, \text{ где}$$

A – ближайшая доза, вызывающая <50% летальных исходов;

a – % летальных исходов, которые вызваны дозой A;

B – ближайшая доза, вызывающая >50% летальных исходов;

b – % летальных исходов, которые вызваны дозой B;

d – интервал или разница между дозами.

2.2.4. Подготовка материала для исследования

Печень перед извлечением из брюшной полости перфузировали *in situ* ледяным 0,9% раствором NaCl через портальную вену. Затем ее гомогенизировали с использованием гомогенизатора Daihan HG-15A в 4х-кратном объеме охлажденной среды выделения, которая содержала: 50 мМ трис-HCl-буфер, pH 7,6 (PanReac, Испания), 10 мМ ЭДТА, 0,5 мМ β- меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich Co., США).

Почки, после промывания ледяным физиологическим раствором, извлекали у животных и осушали фильтровальной бумагой. Затем гомогенизировали в 3,5х-кратном объеме охлажденной среды выделения.

Сердце извлекали у животных после многократного промывания ледяным физиологическим раствором. Промытое сердце осушали фильтровальной бумагой и гомогенизировали в 3х-кратном объеме охлажденной среды выделения. Гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 12 мин. Супернатант использовали для исследования.

Забор крови осуществляли в пробирки типа Eppendorf без антикоагулянта, которые помещали на 10-15 мин в термостат при температуре 37°C. Сыворотку крови получали центрифугированием при 2,5 тыс. об/мин в течение 5 минут.

2.2.5. Определение уровня глюкозы в сыворотке крови

Уровень гликемии в сыворотке крови крыс определяли на 15, 17 и 19-е сутки с начала индукции патологии глюкозооксидазным методом с помощью набора реактивов «ГЛЮКОЗА-12-ВИТАЛ», ООО «Витал-Диагностикс», СПб, Россия.

Принцип метода заключается в том, что при окислении глюкозы кислородом воздуха под действием глюкозооксидазы образуется эквимольное количество H_2O_2 . Под действием пероксидазы H_2O_2 окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного продукта. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации глюкозы в крови.

Реакционную смесь тщательно перемешивали и инкубировали 10 минут при температуре 37°C в термостате. После окончания инкубирования измеряли оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы в кюветах с толщиной поглощающего слоя 5 мм при длине волны 510 нм (табл. 3).

Таблица 3. Количественный анализ определения содержания глюкозы

Реагент	Опытная проба, мл	Калибровочная проба, мл	Контрольная проба, мл
Сыворотка	0,01	-	-
Рабочий реагент	2,0	2,0	2,0
Калибратор	-	0,01	-

Расчет концентрации глюкозы проводили по формуле:

$C = E_0/E_{ст} \times 10$, где E_0 и $E_{ст}$ – экстинкции образца и стандарта, измеренные относительно контроля.

2.2.6. Оценка оксидативного статуса

2.2.6.1. Определение интенсивности биохемилюминесценции

Для определения интенсивности свободнорадикальных процессов применяли метод индуцированной биохемилюминесценции (БХЛ) [15]. Принцип метода основан на реакции каталитического разложения перекиси ионами металла с переходной валентностью – Fe^{2+} , по реакции Фентона. Образующиеся при этом свободные радикалы (R^* , OH^* , RO^* , RO_2^* , O_2^*) вступают в процесс инициации СО в исследуемом биологическом субстрате. Рекомбинация радикалов RO_2^* приводит к образованию неустойчивого тетроксидов, распадающегося с выделением кванта света. В работе использовался биохемилюминометр БХЛ-07 (Medozons, Россия) с программным обеспечением. Кинетическую кривую БХЛ регистрировали в течении 30 секунд и определяли следующие параметры: светосумму хемилюминесценции (S), интенсивность вспышки (I_{max}), характеризующие интенсивность СРП и величину тангенса угла наклона кривой ($tg\alpha_2$), отражающую общую антиоксидантную активность. На интенсивность исследуемого процесса оказывает влияние полный комплекс соединений, обладающих как антиоксидантными, так и прооксидантными действиями, то есть метод дает возможность оценить уровень компенсаторных механизмов свободнорадикального процесса в организме.

Среда для определения параметров БХЛ имела следующий состав: 0,4 мл 0,02 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,5), 0,4 мл 0,01 мМ $FeSO_4$, 0,2 мл 2% раствора H_2O_2 (вносимого непосредственно перед измерением). Исследуемый материал вносили в количестве 0,1 мл перед измерением.

2.2.6.2. Определение содержания диеновых конъюгатов

Содержание ДК определяли на спектрофотометре Hitachi U-1900 при 233 нм. Принцип метода основан на том, что при протекании процессов ПОЛ на этапе генерации АФК в молекулах полиненасыщенных жирных кислот возникает система сопряженных двойных связей, что сопровождается появлением максимума в спектре поглощения при 233 нм [76].

Для определения содержания ДК 125 мкл исследуемого материала (гомогената ткани или сыворотки крови) разбавляли равным объемом физиологического раствора. Затем добавляли по 1,5 мл гептана (Вектон, Россия) и изопропилового спирта (Вектон, Россия). Пробы центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об/мин. 1 мл супернатанта переносили в новые пробирки и добавляли 100 мкл дистиллированной воды. Перемешивали и отбирали 0,5 мл гептановой фазы в новые чистые пробирки. Приливали 2,5 мл этилового спирта и фотометрировали опытные пробы против контроля, которым являлся этанол (96%).

Уровень ДК в гомогенате тканей рассчитывали по формуле:

$$C = \frac{V_{\text{общ}} \times D \times 10^6}{L \times t \times V_{\text{внес}} \times 2,2 \times 10^5}$$

Для расчета содержания ДК в сыворотке крови использовали следующую формулу:

$$C = \frac{D \times 10^6}{L \times V_{\text{внес}} \times 2,2 \times 10^5}$$

В обеих формулах концентрация ДК обозначалась C и выражалась в мкмоль/г ткани или мкмоль/мл сыворотки, $V_{\text{общ}}$ – объем полученного образца (мл), D – величина оптической плотности, L – длина оптического пути (см), $2,2 \times 10^5$ – коэффициент молярной экстинкции ($M^{-1} \text{cm}^{-1}$), $V_{\text{внес}}$ – объем вносимой пробы (мл).

2.2.6.3. Определение степени окислительной модификации белков

Для оценки ОМБ использовали метод, основанный на взаимодействии окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) (Applichem, Германия) с образованием 2,4-динитрофенил-гидразонов (табл. 4) [50]. Оптическую плотность опытной пробы измеряли при 370 нм относительно контрольной пробы. Содержание карбонильных групп (нМ) рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции $\xi = 22.000 \text{ cm}^{-1} \times M^{-1}$.

Таблица 4. Ход определения содержания карбонильных групп

Реактив	Контроль	Опыт	Ход работы
Образец	0,1 мл плазмы или 0,3 мл гомогената	0,1 мл плазмы или 0,3 мл гомогената	-
0,1 М калий- фосфатный буфер (рН 7,4)	Доводили до 1 мл	Доводили до 1 мл	Инкубировали при 37°C 15 мин
HCl (3%)	4 мл	-	-
2,4-ДНФГ + HCl (3%)	-	4 мл	Инкубировали 1 час при комнатной температуре в темноте, перемешивая каждые 15 мин.
ТХУ (20%)	5 мл	5 мл	Помещали в холод на 15 мин, затем центрифугировали 15 мин при 3000 об./мин. Супернатант удаляли.
ТХУ (10 %)	4 мл	4 мл	Центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Супернатант удаляли. Осадок механически разрушали.
Этанол (96%)- этилацетат (1:1)	4 мл	4 мл	Промывали осадок в 3-х кратной повторности.
Мочевина	2 мл	2 мл	Инкубировали 1 час при 37°C, постоянно перемешивая

2.2.6.4. Определение степени фрагментации ДНК

2.2.6.4.1. Выделение тотальной ДНК

Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов «К-Сорб» (Синтол, Россия). Для исследования были использованы образцы печени, почек и сердца.

Для экстракции ДНК в 1,5 мл пробирки типа Eppendorf вносили:

- 1) 200 мкл исследуемого материала;
- 2) 10 мкл протеиназы К;
- 3) 200 мкл лизирующего раствора.

Смешали содержимое пробирок на вортексе, затем инкубировали при температуре 65°C в течение 15 минут, периодически перемешивая. Для осаждения капелек смеси с крышки и стенок пробирки использовали краткосрочное центрифугирование. Затем добавляли 200 мкл осаждающего раствора, перемешивали, краткосрочно центрифугировали. Весь объем смеси переносили на колонку и центрифугировали 1 мин при 8000 об/мин.

Промывали колонку последовательно добавляя 400 мкл промывочного раствора 1, 400 и 200 мкл промывочного раствора 2, входящих в состав набора «К-Сорб». После нанесения каждого раствора смесь центрифугировали как описано выше.

После нанесения на колонку элюирующего раствора, прогретого до 70°C, и центрифугирования в течение 1 мин при 8000 об/мин получали очищенный препарат ДНК.

2.2.6.4.2. Электрофорез ДНК

Фрагментацию ДНК оценивали с помощью электрофореза образца ДНК в 1,5% агарозном геле, используя в качестве буфера 1-кратный трис-ацетат-ЭДТА (ТАЕ) (рН 7,6). Для его наведения использовали 2,42 г трис, 0,186 г ЭДТА, которые разводились в 200 мл стерильной дистиллированной воды, затем к полученному раствору добавляли уксусную кислоту до тех пор, пока значение рН не достигнет нужной величины. Доводили стерильным дистиллятом до объема 500 мл. Буфер для нанесения был приготовлен на основе 1-кратного ТАЕ и содержал 40% сахарозы и 0,25% бромфенолового синего. В качестве маркеров молекулярной массы использовали набор «MassRuler» производства «Fermentas», включающий маркеры от 100 до 10000 нуклеотидных пар.

Для приготовления 1,5% геля растворяли 450 мг агарозы в 30 мл ТАЕ и нагревали раствор до полного расплавления агарозы. После охлаждения раствора до 60°C добавляли бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Раствор перемешивали и выливали в кювету для геля. Вертикально вставляли гребенки так, чтобы зубцы не доставали до дна 1,5 мм. Гель застывал в течение 30 минут, а затем кювету с гелем помещали в электрофоретическую камеру. Заполняли камеру однократным ТАЕ и извлекали гребенки.

Образцы исследуемой и маркерной ДНК подготавливали к электрофорезу путем их смешивания с буфером для нанесения. Затем в лунки осторожно вносили по 10 мкл образцов ДНК. Электрофорез проводили при 100 В в течение 1-2 часов. Просматривали гель в УФ-свете на трансиллюминаторе и фотографировали.

2.2.7. Измерение активности ферментов

Активность ферментов в тканях исследуемых животных представляли в виде удельной активности, E на грамм сырой массы и E на мл сыворотки. Единицу активности (E) рассчитывали, как количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при температуре 25°C. Определение активности ферментов проводили на спектрофотометре Hitachi U-1900 с программным обеспечением.

2.2.7.1. Определение активности ферментов, сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями НАДФ

О скорости ферментативных реакций, сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями НАДФ, судили по изменению оптической плотности при 340 нм. Расчет активностей ГП, ГР, Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ производили по следующей формуле:

$$E = \frac{D \times V \times 1,0}{\Delta V \times t \times 6,22}$$

, где

D – изменение оптической плотности за промежуток времени t при длине волны 340 нм;

1,0 – объем раствора, находящегося в кювете, мл;

V – общий объем ферментного раствора, мл;

ΔV – объем пробы, вносимый в кювету, мл;

t – промежуток времени измерения, мин;

6,22 – молярный коэффициент экстинкции для дегидрогеназ, численно равный значению поглощения, которую дает 1 мл раствора, содержащий 1 мкмоль кофермента, при спектрофотометрировании с толщиной поглощающего слоя измеряемого раствора 1 см.

2.2.7.1.1. Определение активности глутатионпероксидазы

О скорости ГП-реакции судили по уменьшению оптической плотности опытных образцов при 340 нм в результате окисления НАДФН, протекающего за счет осуществления сопряженных ферментативных реакций: образования окисленного глутатиона под действием ГП и его последующего восстановления, взаимосвязанного с окислением НАДФН под действием ГР. Измерение активности ГП проводили в среде: 0,05 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,4), содержащий 1 мМ ЭДТА (Вектон, Россия), 0,12

мМ НАДФН (AppliChem GmbH, Германия), 0,85 мМ восстановленного глутатиона (Carl Roth GmbH + Co. KG, Германия), 0,37 мМ H_2O_2 , 1 ед/мл ГР (Sigma-Aldrich Co., США). Контрольная проба не содержала восстановленный глутатион.

2.2.7.1.2. Определение активности глутатионредуктазы

О скорости ГР-реакции судили по уменьшению оптической плотности опытных образцов при 340 нм в результате окисления НАДФН, протекающего за счет осуществления реакции восстановления глутатиона под действием ГР. Измерение активности ГР проводили в среде: 0,05 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,4), содержащий 1 мМ ЭДТА (Вектон, Россия), 0,16 мМ НАДФН (AppliChem GmbH, Германия), 0,8 мМ окисленного глутатиона (Carl Roth GmbH + Co. KG, Германия).

2.2.7.1.3. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы

Об активности Г6ФДГ судили по увеличению оптической плотности опытных образцов при длине волны 340 нм, наблюдаемому при образовании 6-фосфоглюконолактона из глюкозо-6-фосфата в результате восстановления НАДФ. Среда спектрофотометрирования Г6ФДГ представляла собой 50 мМ трис – HCl – буфер, рН 7,8 (PanReas, Испания), содержащий 3,2 мМ глюкозо-6-фосфата (Sigma-Aldrich Co., США), 0,25 мМ НАДФ (AppliChem GmbH, Германия), 1,0 мМ MnCl_2 (Вектон, Россия). Реакцию начинали внесением ферментного препарата в среду.

2.2.7.1.4. Определение активности НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы

Скорость окислительного декарбоксилирования изоцитрата, катализируемого НАДФ-ИДГ, рассчитывали по возрастанию оптической плотности в результате восстановления НАДФ. Среда для измерения активности НАДФ-ИДГ содержала следующие компоненты: 50 мМ трис- HCl -буфер, рН 7,8 (PanReas, Испания), содержащий 1,5 мМ изоцитрата (Sigma-Aldrich Co., США), 2 мМ MnCl_2 (Вектон, Россия), 0,4 мМ НАДФ (AppliChem GmbH, Германия).

2.2.7.2. Определение активности глутатионтрансферазы

О скорости ГТ-реакции судили по возрастанию оптической плотности опытных образцов при 340 нм.

Определение активности фермента проводили с субстратом 1-хлор, 2,4-динитробензолом, превращение происходило по следующей схеме:



Среда для измерения активности ГТ содержала следующие компоненты: 0,1 М калий-фосфатный-буфер, рН 7,4 (Вектон, Россия), содержащий 1 мМ ЭДТА (Вектон, Россия), 1 мМ 1-Cl-2,4-динитробензол, 5 мМ GSH (Carl Roth GmbH + Co. KG, Германия).

Расчет активности глутатионтрансферазы производили по формуле:

$$E = \frac{D \times V \times 1,0}{\Delta V \times t \times 9,6}$$

, где

D – прирост оптической плотности за промежуток времени t при $\lambda=340$ нм;

1,0 – объем раствора, находящегося в кювете, мл;

V – общий объем ферментного раствора, мл;

ΔV – объем пробы, вносимый в кювету, мл;

t – промежуток времени измерения, мин;

9,6 – молярный коэффициент экстинкции для глутатион-динитробензола, численно равный значению поглощения, которую дает 1 мл раствора, содержащий 1 мкмоль конъюгата, при спектрофотометрировании при толщине поглощающего слоя измеряемого раствора 1 см.

2.2.7.3. Определение активности аконитатгидратазы

Активность АГ определяли спектрофотометрически при 233 нм. О скорости дегидратации цитрата в ходе АГ-реакции судили по возрастанию оптической плотности в результате образования двойной связи в молекуле *цис*-аконитата. Для определения активности АГ использовали среду следующего состава: 50 мМ трис-НСl-буфер, рН 7,8 (PanReas, Испания), содержащий 0,15 мМ цитрат (Вектон, Россия). Реакцию начинали добавлением аликвоты ферментного препарата в спектрофотометрическую среду. Количество E рассчитывали по формуле:

$$E = \frac{D \times V \times V_1}{\Delta V \times t \times \varepsilon}, \text{ где}$$

- D – изменение оптической плотности пробы в единицу времени измерения t ;
- V - общий объем ферментного раствора, мл;
- V_1 - объем реакционной среды, используемой для измерения активности фермента, мл;
- ΔV - объем ферментного раствора, внесенный для измерения, мл;
- ε - коэффициент молярной экстинкции для хромофорной группы субстрата, отражающий изменение оптической плотности при окислении или восстановлении 1 мМ субстрата в 1 мл среды (для *цис*-аконитата – 3,08);
- t - время измерения активности фермента, мин.

2.2.7.4. Определение активности супероксиддисмутазы

Активность СОД определяли по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в неэнзиматической системе феназинметасульфата (ФМС) и НАДН [43]. Среда спектрофотометрирования включала следующие компоненты: 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,8) (Вектон, Россия), содержащий 0,33 мМ ЭДТА (Вектон, Россия), 0,41 мМ НСТ (Thermo Fisher Scientific Inc., США), 0,01 мМ ФМС (AppliChem GmbH, Германия); 0,8 мМ НАДН (AppliChem GmbH, Германия). Исследуемый образец вносили в количестве 0,03 мл на 1 мл среды инкубации. Реакцию запускали добавлением НАДН. Регистрировали прирост оптической плотности за 5 мин. при длине волны 540 нм.

За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимого для 50%-ого ингибирования восстановления НСТ.

Расчет вели по формуле:

$$\left(100 - \frac{E_0 \times 100}{E_k} \right) / 50 \times \text{мг белка} = \text{усл.ед. на 1 мг белка},$$

где E_0 и E_k - среднее значение прироста экстинкции за 1 мин. $E/5$ мин соответственно в опытной и контрольной пробах.

2.2.7.5. Определение активности каталазы

Используемый метод определения активности каталазы основан на способности пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс (табл. 5). Активность исследуемого фермента определяли спектрофотометрически при длине волны 410 нм [45]. В ходе определения активности каталазы использовали

следующие реактивы: буферно-субстратная смесь, содержащая 10 мл трис-НСl-буфера (рН 7,4) (PanReas, Испания) и 30 мл 0,08% пероксида водорода; 4,5% раствор аммония молибденовокислого (Вектон, Россия).

Таблица 5. Ход определения активности каталазы

Реактивы	Контроль	Опыт	Примечание
Буферно-субстратная смесь	2 мл	2 мл	10 минут при 37°C
Гомогенат	-	0,1 мл	3 минуты при 37°C
Молибдат аммония	2 мл	2 мл	-
Гомогенат	0,1 мл	-	-

В качестве раствора сравнения использовали: 1 мл буфера, 3 мл дистиллированной воды и 0,1 мл гомогената.

Расчет результатов производили по следующей формуле:

$$A = \frac{(E_k - E_o) \times 1,0 \times 10^4 \times 4,1 \times 10^6}{22,2 \times 10^6 \times 3}$$

где $1,0 \times 10^4$ фактор разведения; 4,1 – конечный объем пробы; 10^6 – коэффициент пересчета на мкм; $22,2 \times 10^6$ – коэффициент молярной экстинкции H_2O_2 ; 3 – время инкубации, мин.

2.2.8. Определение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов.

2.2.8.1. Выделение тотальной РНК

Выделение суммарной клеточной РНК производили с использованием набора "РНК-Экстран" (Синтол, Россия) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Качество выделенной РНК оценивали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, содержащим бромистый этидий в концентрации 0,5 мкг/мл, и последующей визуализации на трансиллюминаторе при длине волны 365 нм. Определение концентрации РНК проводили на спектрофотометре Hitachi – U1900 при длине волны 230 - 280 нм. Образец считали чистым и пригодным для дальнейших манипуляций, когда соотношение оптических плотностей при 260 и 280 было около 2,0, а соотношение при 260 и 230 было в диапазоне 2,0-2,2. В случае получения существенно более низких результатов, проводили повторное выделение РНК.

2.2.8.2. Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция

Для синтеза первой цепи комплементарной ДНК использовали рекомбинантную обратную транскриптазу вируса мышинного лейкоза Молони – M-MuLV. В качестве затравочного праймера использовали смесь праймеров олиго-(dT)₁₅ + Random, что позволяет избирательно перевести в форму ДНК только молекулы информационной РНК, представляющих собой транскрипты работающих генов. С целью предотвращения деградации молекул РНК в реакционную смесь вносили ингибиторы РНКаз. Синтез кДНК проводили при температуре 42°C в течение 40 минут. Инактивацию M-MuLV ревертазы осуществляли путем прогревания пробирок при 92°C в течение 5 минут. Полученные в ходе обратной транскрипции продукты использовали для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Для амплификации определенных участков генов был разработан комплект генспецифических праймеров, с использованием программного обеспечения «Genamics Expression» (табл. 6).

Таблица 6. Праймеры генов, использованных для проведения ПЦР

Обозначение транскрипта	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>Sod1</i>	GGTCCAGCGGATGAAGAG	GGACACATTGGCCACACC
<i>Cat</i>	GCTAATGAAGACAACGTCACCTCA	TGTTCTCACACAGGCGTTTC
<i>Gpx1</i>	CGACATCGAACCCGATATAGA	ATGCCTTAGGGGTTGCTAGG
<i>Gsr</i>	TTCCTCATGAGAACCAGATCC	TGAAAGAACCCATCACTGGTTA
<i>GAPDH</i>	CCCTCAAGATTGTCAGCAATG	AGTTGTCATGGATGACCTTGG
<i>ACTB</i>	CCCGCGAGTACAACCTTCT	CGTCATCCATGGCGAACT

Специфичность отжига праймеров проверяли с помощью программы «Blast» (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/). Праймеры по предоставленным последовательностям были синтезированы фирмой ЗАО «Синтол» (Россия).

Для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I использовали набор реактивов фирмы «Синтол» (Россия). В качестве матрицы использовали кДНК, полученную на предыдущем этапе. Исследование проводили на приборе АНК – 32. Схема проведения анализа была следующая: первоначальный прогрев смеси в течении 3 минут при 95°C, затем 40 циклов, состоящих из этапов денатурации (95°C – 15 секунд), отжига праймеров (60°C – 15 секунд) и элонгации (72°C – 30 секунд). После окончания ПЦР-РВ анализировали значения пороговых циклов. Для исключения ложноположительных результатов одновременно с исследуемыми образцами проводили амплификацию отрицательно-контрольных образцов: а) на загрязнение компонентов наборов чужеродной ДНК; б) на чистоту условий подготовки образцов для амплификации. Реакционная смесь отрицательного контроля имела тот же состав, что и опытные образцы, только вместо исследуемого образца ДНК вносили соответствующий объем воды. Уровень транскриптов исследуемых генов оценивали относительно гена «домашнего хозяйства» - глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (*GAPDH*) и гена бета-актина (*ACTB*). Определение относительного уровня экспрессии исследуемых генов осуществляли с применением $2^{-\Delta\Delta C_t}$ метода [155].

2.2.9. Определение содержания компонентов неферментативной антиоксидантной системы

2.2.9.1. Определение концентрации восстановленного глутатиона

Концентрацию восстановленного глутатиона определяли с помощью реакции с 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой (реактив Элмана) (Sigma-Aldrich Co., США), в результате которой образуется тионитрофенильный анион, имеющий максимум поглощения при длине волны 412 нм [15]. Все остальные реактивы, используемые в ходе определения концентрации восстановленного глутатиона, были фирмы «Вектон» (Россия) (табл. 7).

Измеряли оптическую плотность опытной и контрольной проб против фосфатного буфера (рН 7,4). Расчет концентрации восстановленного глутатиона производили по формуле:

$$C = \frac{E_{оп} - E_{к}}{13,1 \times 10^3} \times 72,6 \times 10^3,$$

где

C – содержание GSH, ммоль/л;

E_{оп} – оптическая плотность опытной пробы;

Ек – оптическая плотность контрольной пробы;

$13,1 \times 10^3$ – коэффициент молярной экстинкции тионитрофенильного аниона при 412 нм;

$72,6 \times 10^3$ – фактор разведения.

Таблица 7.

Методика определения содержания восстановленного глутатиона в печени, почках, сердце и сыворотке крови крыс

Реактив	Объем внесения, мл	Ход работы
Гомогенат ткани / сыворотка крови	0,5	Добавляли в пробирку для центрифугирования
Фосфатный буфер 0,1 М (рН 7,4)	3,5	Перемешивали, отбирали 2 мл
H ₂ O (дистил.)	14	Разводили отобранную суспензию в 8 раз
ТХУ (20%)	1	Перемешивали и оставляли в холодильнике на 15-20 мин. Затем центрифугировали при 4000g в течение 15 мин. Отбирали 1 мл надосадочной жидкости.
Фосфатный буфер (рН 7,4)	0,5	Добавляли в пробирку с надосадочной жидкостью
Реактив Элмана	0,05	Добавляли в опытную пробирку
Этанол	0,05	Добавляли в контрольную пробирку

2.2.9.2. Определение содержания цитрата

Количество цитрата определяли по методу Нательсона [5]. Метод состоит в образовании из цитрата при помощи бромного реактива и перманганата калия пентабромацетона, его экстракции петролейным эфиром и определении поглощения окрашенного комплекса с тиомочевинной при длине волны 430 нм. В ходе работы использовались все реактивы фирмы «Вектон» (Россия) (табл. 8).

Методика определения содержания цитрата в печени, почках, сердце и сыворотке крови крыс

Реактив	Объем внесения, мл	Ход работы
Гомогенат ткани / сыворотка крови	1	Добавляли в пробирку для центрифугирования
ТХУ (17%)	0,8	Центрифугировали при 4000g в течение 5 мин, затем отбирали 0,5 мл надосадочной жидкости в пробирку с притертой пробкой
H ₂ SO ₄ (50%)	0,25	Добавляли поочередно к надосадочной жидкости, затем охлаждали в течение 20 мин.
KBr 1 М	0,1	
KMnO ₄ (насыщенный р-р)	0,5	
H ₂ O ₂ (3%)	Несколько капель	Устраняли избыток перманганата калия до обесцвечивания
Гексан	1,3	Добавляли двукратно в объеме 0,5 мл, заключительный раз в объеме 0,3 мл для экстрагирования образовавшегося пентобромацетата. После каждой порции гексана экстракт встряхивали в течение 5 мин на шюттель-аппарате. 1 мл полученного гексанового экстракта переносили в пробирку с притертой пробкой
Раствор тиомочевины в боратном буфере (2%)	2,5	Предварительно добавляли в пробирку, в которую затем вносили гексановый экстракт. Встряхивали в течение 5 мин, после расслоения фаз окрашенный в светло-желтый цвет нижний слой осторожно отсасывали с помощью пипетки Пастера с оттянутым концом

Интенсивность окраски определяли спектрофотометрически. Фотометрирование проводили против контроля, для получения которого брали 0,5 мл 10%-ного раствора ТХУ и также обрабатывали.

2.2.10. Определение содержания общего белка

Содержание белка определяли с помощью набора реактивов «Ольвекс» (Россия) унифицированным биуретовым методом, в ходе которого белки реагируют в щелочной среде с сернистой медью с образованием соединения, окрашенного в фиолетовый цвет.

В две пробирки наливали по 2 мл биуретового реактива. В опытную пробирку добавляли 0,04 мл исследуемого образца, а в контрольную - 0,04 мл изотонического раствора NaCl. Содержимое пробирок тщательно перемешивали. Через 30 мин. опытную пробу фотометрировали против контрольной при длине волны 540-560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Из калибровочного раствора альбумина готовили рабочие растворы с различной концентрацией белка. Из каждого рабочего калибровочного раствора брали по 0,04 мл и вносили в пробирки, содержащие по 2 мл биуретового реактива. Через 30 мин. все пробы фотометрировали против контрольной при длине волны 540-560 нм.

Расчет вели по калибровочному графику, для построения которого откладывали по оси абсцисс концентрацию белка в г/л, по оси ординат - величину экстинкции. Калибровочный график линеен до величины экстинкции 0,5. При более высокой величине экстинкции биопробу разводили изотоническим раствором NaCl в соотношении 1:1.

Содержание белка в пробе можно также рассчитать по формуле:

Концентрация белка = оптическая плотность пробы × коэффициент (k), где k - концентрация стандартного раствора альбумина / оптическая плотность стандарта.

2.3. Статистическая обработка экспериментальных данных

Опыты проводили в 13-20-ти кратных биологических повторностях. Аналитические повторы были проведены дважды для каждой пробы. Для проверки гипотезы о соответствии распределения полученных вариантов нормальному распределению использовали критерий Колмогорова - Смирнова в модификации Лиллиефорса. Результаты исследования обрабатывали с использованием показателей описательной статистики: выборочного среднего (\bar{X}), выборочного стандартного отклонения (S), стандартной ошибки среднего ($S_{\bar{X}}$) по следующим формулам:

$$\bar{X} = \frac{\sum x}{n}; \quad s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{X})^2}{n-1}}; \quad s_{\bar{X}} = \frac{s}{\sqrt{n}},$$

где X – значение параметра,

n – объем выборки,

s – выборочное стандартное отклонение.

Полученные результаты опытных образцов сравнивали с контролем. В таблицах и на рисунках представлены данные как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Результаты эксперимента анализировали с использованием t-критерия Стьюдента с расчетом среднего значения, стандартного отклонения. Достоверно различающимися считали значения, для которых $p < 0,05$ [39].

ГЛАВА 3. ВОЗДЕЙСТВИЕ БИГУАНИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЙ ГОМЕОСТАЗ ПРИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

3.1. Поиск бигуанидиновых производных с целевой биологической активностью

В настоящее время доступные для исследования бигуаниды можно разделить на следующие группы:

1. Ароматические и жирноароматические (соединения 1-7 в соответствии с рис. 4), с различными заместителями в бензольном кольце: R = H, Alk, AlkO, Hal, COOAlk, NO₂ и их комбинации.
2. Алифатические (соединения 8-9 в соответствии с рис. 4).
3. С индольным фрагментом (соединение 10 в соответствии с рис. 4).
4. Производные пиперазина (соединение 11 в соответствии с рис. 4).

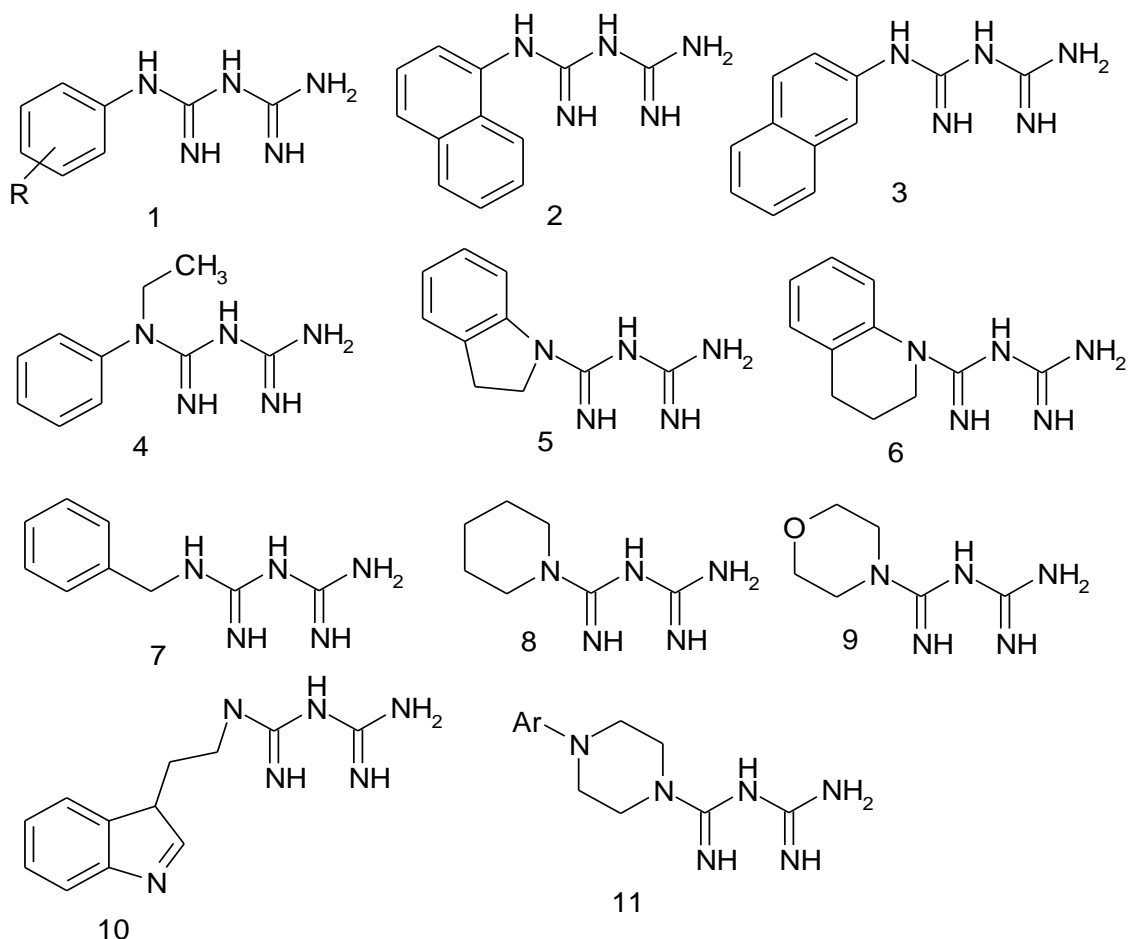


Рис. 4. Структурные формулы бигуанидов, доступных для исследования

Кроме этого, представляет интерес исследование продуктов превращения бигуанидов, прежде всего, вида 12, где R₁, R₂- различные алкильные, арильные,

гетарильные заместители (соединения 12 в соответствии с рис. 5). Хотя, возможны и другие структуры на основе бигуанидов.

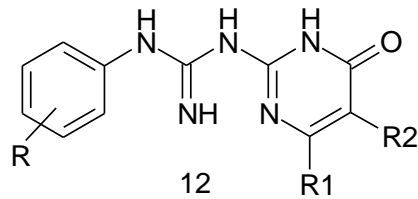


Рис. 5. Общая структурная формула производных бигуанидов

В нашей работе на первом этапе был проведен поиск бигуанидов и их производных с целевой биологической активностью с помощью программы прогноза «структура-свойство» PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances – предсказание спектра активности веществ), доступной в режиме on-line по адресу <http://www.ibmh.msk.su/pass> [188]. Компьютерному анализу было подвергнуто несколько десятков веществ с наиболее высокой вероятностью проявления той или иной активности. В результате были отобраны бигуаниды с предполагаемым спектром биологической активности, представляющей интерес с точки зрения возможного положительного воздействия на течение патологического процесса. Для отобранных бигуанидов – НИПМГ и ДКБ (рис. 6), были характерны следующие виды вероятной активности: цитопротекторные, иммуностимулирующие, антиангинальные, кардиопротекторные и кардиотонические свойства, способность выступать в качестве сквенджера свободных радикалов, регулировать проницаемость клеточных мембран, стимулировать функции почек, ангиогенез, проявлять антидиабетическую и антиишемическую активность с вероятностью проявления (P_a), лежащей в пределах: 0,45-0,70.

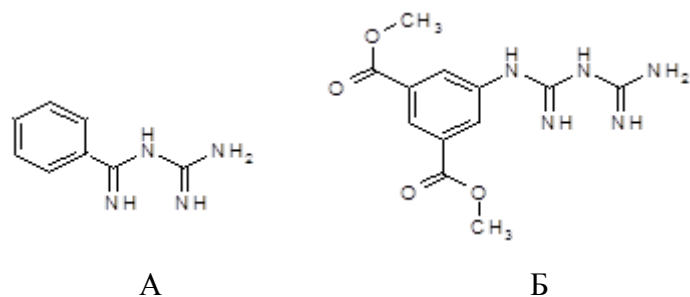


Рис. 6. Структурные формулы N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина (А) и 1,3-диметил 5- [(карбамимидамидометанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата (Б)

Таким образом, с помощью компьютерной программы PASS был проведен скрининг базы данных по структурам, и были отобраны производные гуанидина – бигуаниды, с предполагаемым спектром биологической активности, которые в дальнейшем были протестированы на животных.

3.2. Определение токсичности N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина и 1,3-диметил 5- [(карбамимидаметанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата

При изучении острой токсичности бигуанидиновых производных, НИПМГ и ДКБ, при внутрибрюшинном введении крысам в дозах, меньших 200 мг/кг массы тела, выраженных признаков токсического действия исследуемых соединений на экспериментальных животных не наблюдалось. При тестировании доз 200-300 мг/кг наблюдали признаки отравления, которые начинали проявляться через 25–30 мин. Отмечалось снижение подвижности, угнетение реакций на внешние раздражители, седация, урежение дыхания. Наблюдаемые клинические проявления без признаков их усугубления отмечались в течение первых суток. Погибших животных не зафиксировано (табл. 9-10). После введения крысам данных веществ в дозах 300-600 мг/кг признаки отравления прослеживались на 5-й минуте эксперимента. В этот период наблюдалось резкое угнетение подвижности, снижение болевой и тактильной чувствительности, а также реакций на стук и хлопки. Частота дыхания у животных снижалась в среднем на 20–30 %, повышались акты уринаций и дефекаций. Впоследствии (на 7–10 мин) у крыс начинали фиксироваться редкие тонико-клонические судороги, мышечная атония, резко снижалось дыхание, оно становилось поверхностным, не ритмичным. Гибель отдельных животных отмечалась на 15 мин, а также и в другие периоды времени первых суток наблюдений (табл. 9-10). У оставшихся в живых особей реабилитация состояния физической активности завершалась лишь на 2–3 сутки.

После введения крысам высоких доз (600-900 мг/кг) НИПМГ и ДКБ наблюдалась картина острой интоксикации. В частности, у животных нарушалась координация движений, переходящая в адинамию, значительно уменьшалась частота и глубина дыхательных движений, снижалась реакция на внешние раздражители. Гибель большей части животных отмечалась в первые 3 часа (табл. 9-10). Летальному исходу предшествовали глубокая седация, угнетение сознания, боковое положение, тонические и клонические судороги. В последующее время наблюдения (с третьего часа и до семи суток) у выживших животных отмечалась постепенная нормализация поведенческой, пищевой и двигательной активности, отсроченной гибели не наблюдалось.

Таблица 9. Расчет среднелетальной дозы НИПМГ для лабораторных крыс по Беренсу

Группы	Доза, мг/кг	Число погибших/ число животных в группе	Число выживших/ число животных в группе	Накопленные частоты		% погибших
				погибло	выжило	
1	200	0/10	10/10	0	35	0
2	300	2/10	8/10	2	25	7,4
3	400	4/10	6/10	6	17	26,0
4	500	5/10	5/10	11	11	50,0
5	600	6/10	4/10	17	6	73,0
6	700	8/10	2/10	25	2	92,5
7	800	10/10	0/10	35	0	100,0

$$LD_{50} = 561,7 \pm 28,1 \text{ мг/кг}$$

Таблица 10. Расчет среднелетальной дозы ДКБ для лабораторных крыс по Беренсу

Группы	Доза, мг/кг	Число погибших/ число животных в группе	Число выживших/ число животных в группе	Накопленные частоты		% погибших
				погибло	выжило	
1	300	0/10	10/10	0	36	0
2	400	1/10	9/10	2	26	7,1
3	500	3/10	7/10	4	17	19,0
4	600	5/10	5/10	11	11	50,0
5	700	7/10	3/10	16	5	76,2
6	800	8/10	2/10	24	2	92,3
7	900	10/10	0/10	34	0	100,0

$$LD_{50} = 620,6 \pm 31,0 \text{ мг/кг}$$

С учетом полученных значений среднелетальных доз и классификации токсичности веществ по Березовской И.В. НИПМГ и ДКБ можно отнести к классу малотоксичных соединений [12].

3.3. Воздействие бигуанидиновых производных на уровень гликемии у крыс

Контроль развития патологии у крыс осуществляли по оценке уровня гликемии. Было выявлено прогрессирующее увеличение содержания глюкозы в сыворотке крови животных, которым вводили протамин-сульфат, способный связываться с эндогенным

гепарином и в комплексе с ним вызывать состояние резистентности по отношению к гипогликемическому действию как эндогенного, так и экзогенного инсулина [81]. Содержание глюкозы в сыворотке крыс через три недели после начала введения протамин-сульфата превышало уровень гликемии у контрольных животных в 3,3 раза (рис. 7).

Схожая тенденция была отмечена и для стрептозоциновой модели индукции гипергликемии: количество глюкозы увеличилось в 2,9 раза (рис. 8). В настоящее время стрептозоцин широко используется для развития как инсулинозависимого, так и не инсулинозависимого СД путем индуцирования гибели β -клеток за счет алкилирования ДНК. Несмотря на то, что стрептозоцин в высоких дозах заметно ухудшает секрецию инсулина, имитируя СД1, низкая доза, как известно, вызывает незначительное нарушение секреции инсулина, которое схоже с клиническими особенностями более поздней стадии диабета 2-го типа [207]. Поэтому данная модель индукции гипергликемии у крыс имитирует естественное течение заболевания (от инсулинорезистентности до дисфункции β -клеток), а также дает результаты, сходные с метаболическими характеристиками пациентов с СД2.

Введение крысам НИПМГ и ДКБ во всех исследуемых дозах приводило к снижению концентрации глюкозы в крови. Так, при введении НИПМГ в дозах 10, 15 и 25 мг/кг при реализации протамин-сульфатной модели индукции гипергликемии, уровень глюкозы на 19 сутки после начала эксперимента снижался в 2,6, 2,3 и 2,5 раза (рис. 7). При введении ДКБ в тех же дозах уровень гликемии у крыс при патологии, индуцированной протамин-сульфатом, изменялся в сторону контроля, снижаясь в 2,2, 2,3 и 2,4 раза соответственно. При развитии патологии, вызванной введением стрептозоцина, НИПМГ и ДКБ оказывали сходный эффект, снижая концентрацию глюкозы на последней неделе эксперимента в 2,0 раза (рис. 8). Можно предположить, что наблюдаемый гипогликемический эффект НИПМГ и ДКБ в условиях экспериментального моделирования патологии, который, вероятно, может быть достигнут в полной мере при более длительном их введении, связан со способностью бигуанидиновых производных повышать чувствительность к инсулину периферических тканей (преимущественно поперечно-полосатой мускулатуры, в меньшей степени – жировой ткани) [9]. Подтверждением этому могут служить данные, полученные при введении животным с патологией метформина: этот используемый в терапии СД2 препарат также не вызывал в данных условиях эксперимента нормализацию уровня глюкозы (снижая ее уровень в 2,6 раза). По аналогии с метформином, исследуемые вещества, видимо, могут усиливать связывание инсулина с рецепторами в разных тканях – эритроцитах, моноцитах,

гепатоцитах, адипоцитах, миоцитах, увеличивая при этом скорость поступления глюкозы в клетки.

Это согласуется с имеющимися данными о том, что метформин способен улучшать транспорт глюкозы белками-переносчиками GLUT-1, локализующимися в плазматической мембране, и GLUT-4, расположенными преимущественно во внутриклеточных мембранах [71].

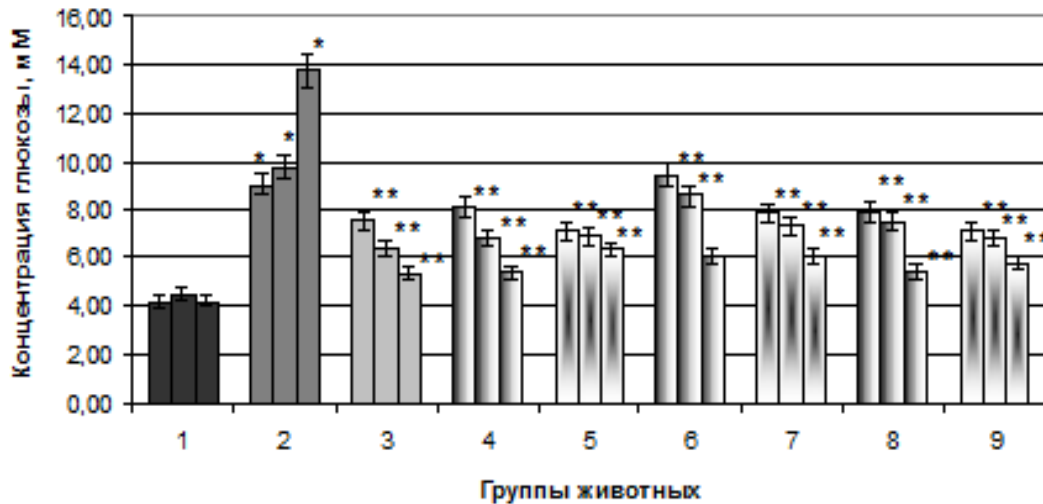


Рис. 7. Изменения концентрации глюкозы в крови животных контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9) на 15-е (1-й столбец), 17-е (2-й столбец) и 19-е (3-й столбец) сутки эксперимента
*Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии*

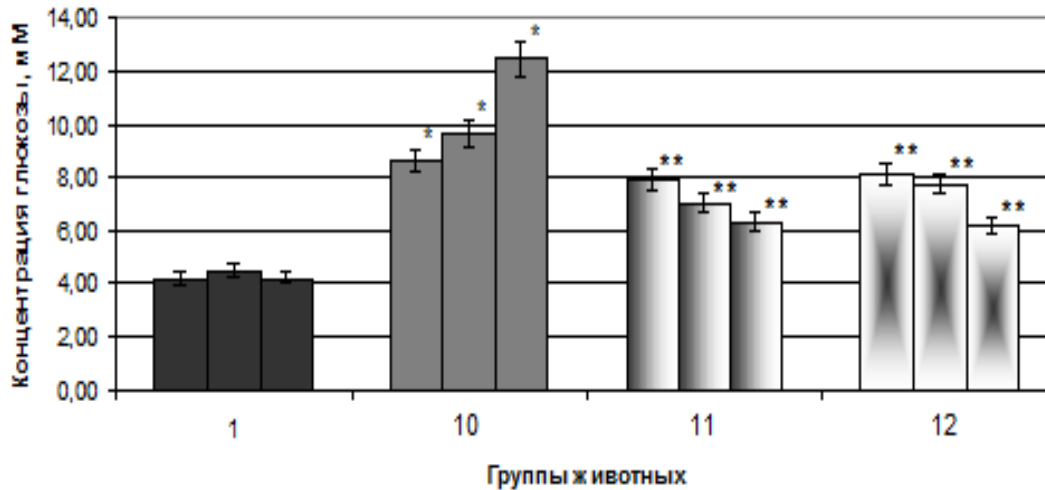


Рис. 8. Изменения концентрации глюкозы в крови животных контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12) животным с патологией на последней неделе эксперимента. Различия достоверны при $p \leq 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии

Так как нарушение метаболизма глюкозы является пусковым фактором в развитии ОС при СД, а бигуанидиновые производные способны снижать уровень гликемии в эксперименте у животных, целесообразно изучение воздействия данных соединений на свободнорадикальный гомеостаз в условиях развития патологии.

3.4. Оценка интенсивности свободнорадикального окисления биомолекул в тканях и сыворотке крови крыс с гипергликемией при введении N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина и 1,3-диметил 5-[(карбамимидамометанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата

3.4.1. Влияние бигуанидиновых производных на интенсивность биохемилюминесценции и уровень первичных продуктов пероксидного окисления липидов в тканях и сыворотке крови крыс с гипергликемией

Известно, что важным фактором в патогенезе осложнений СД является ОС [33]. В этой связи для определения интенсивности свободнорадикальных процессов и общей антиоксидантной активности при гипергликемии у крыс и введении исследуемых бигуанидов был применен метод биохемилюминесценции (БХЛ).

При развитии патологии, индуцированной как введением протамина-сульфата, так и стрептозоцина, наблюдалось возрастание значений светосуммы БХЛ (S) и интенсивности максимальной вспышки (I_{\max}) в тканях крыс относительно показателей у контрольных

животных (табл. 11-14), что свидетельствует о возрастании интенсивности СО биомолекул. Так, параметр S возрастал в печени, почках, сыворотке крови и в сердце соответственно в 2,6, 2,4, 2,1 и 2,2 раза, а параметр I_{\max} – в 2,6, 3,0, 2,1, 2,5 раза у животных с гипергликемией, вызванной введением стрептозоцина. Также, в результате проведенных исследований у животных с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином на фоне жировой диеты, было выявлено увеличение значения $\text{tg}\alpha_2$ - параметра БХЛ, характеризующего общую антиоксидантную активность (табл. 11-14). В печени значение $\text{tg}\alpha_2$ увеличилось в 2,5 раза, в почках – в 2,4 раза, в сыворотке крови – в 2,3 раза и в сердце – в 2,1 раза относительно контроля. Можно предположить, что в условиях развития патологии происходит мобилизация компенсаторных механизмов, направленных на снижение интенсивности свободнорадикальных процессов в исследуемых тканях.

При введении как препарата сравнения, так и НИПМГ, и ДКБ крысам с патологией, индуцированной протамин-сульфатом, наблюдалось снижение S в исследуемых тканях по сравнению с показателем при гипергликемии (табл. 11-14). Так, величина S при действии НИПМГ и ДКБ в дозе 10 мг/кг снижалась в печени крыс соответственно в 2,1 и 1,6 раза, в почках – в 1,7 и 1,6 раза, в сердце – 2,2 и 1,4 раза и сыворотке крови – в 1,9 и 1,7 раза, изменяясь в направлении контроля. Введение метформина, НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг приводило к снижению данного показателя в печени – в 1,6, 2,5 и 1,5 раза, в почках – в 1,5 (метформин, НИПМГ) и 1,3 раза (ДКБ), в сердце – в 1,7 (метформин, ДКБ) и 2,2 раза (НИПМГ) и в сыворотке крови – в 1,7, 2,2 и 1,3 раза относительно данных, полученных при патологии. При введении НИПМГ и ДКБ в дозе 25 мг/кг, параметр S изменялся следующим образом: снижался в печени крыс в 1,7 и 1,4 раза, в почках – в 1,4 раза, в сердце – в 1,4 и 1,3 раза и в сыворотке крови – в 2,3 и 1,2 раза, изменяясь в сторону контрольных значений. Сходным образом изменялся этот параметр в тканях крыс при действии НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг на фоне развития гипергликемии, вызванной введением стрептозоцина (табл. 11-14).

Применение тестируемых бигуанидов на фоне развития гипергликемии при реализации обеих моделей ее индукции изменяло параметр БХЛ I_{\max} в сторону нормализации в тканях крыс (табл. 11-14). Так, введение НИПМГ и ДКБ в дозе 10 мг/кг способствовало снижению I_{\max} в печени в 1,9 и 1,7 раза, в почках – в 1,8 раза, в сердце – в 2,4 и 1,9 раза и в сыворотке крови – в 1,7 и 1,6 раза соответственно на фоне протаминсульфатной модели. Под действием препарата сравнения и исследуемых бигуанидиновых производных в дозе 15 мг/кг наблюдались следующие изменения: в печени значения данного параметра снижались в 1,2 (метформин, ДКБ) и 1,4 раза

(НИПМГ), в почках – в 1,8, 1,9 и 1,5 раза, в сердце – в 1,2, 2,5 и 2,4 раза и в сыворотке крови – в 1,4 (метформин) и 1,3 раза (НИПМГ, ДКБ). Введение НИПМГ и ДКБ в той же дозе при реализации стрептозоциновой модели изменяло в сторону контрольных значений I_{\max} , снижая его в печени крыс в 1,6 и 1,2 раза, в почках – 2,1 и 1,8 раза, в сердце – в 1,6 и 1,7 раза и в сыворотке крови – в 2,0 и 1,3 раза соответственно. При тестировании бигуанидиновых производных в дозе 25 мг/кг на фоне протамин-сульфатной модели гипергликемии I_{\max} снижался в печени в 1,5 и 1,3 раза, в почках – в 2,0 и 1,6 раза, в сердце – в 2,2 и 1,3 раза и в сыворотке крови – в 1,2 раза соответственно по сравнению с данными при патологии. Регистрируемое снижение уровня СО может быть результатом проявления антиоксидантных свойств бигуанидиновых производных, причем наиболее эффективным в этом плане оказалось введение НИПМГ в дозах 10 и 15 мг/кг при гипергликемии, индуцированной протамин-сульфатом, и НИПМГ в дозе 15 мг/кг на фоне развития патологии, вызванной действием стрептозоцина.

В ходе эксперимента было зарегистрировано изменение значений $tg\alpha_2$ в сторону снижения под воздействием бигуанидиновых производных во всех исследуемых дозах на фоне развития гипергликемии, вызванной введением протамин-сульфата (рис. 11-14). Так, при введении НИПМГ в дозах 10, 15 и 25 мг/кг животным с патологией $tg\alpha_2$ снижался в печени – в 2,0, 1,9 и 1,4 раза, в почках – в 1,4, 1,6 и 1,7 раза, в сыворотке крови – в 2,1, 1,3 и 1,5 раза, в сердце – в 1,7 (10 мг/кг) и 1,8 раза (15 и 25 мг/кг) по сравнению с группой животных с гипергликемией. При введении ДКБ в дозах 10, 15 и 25 мг/кг крысам с гипергликемией установлено, что величина $tg\alpha_2$ снижалась в печени в 1,9, 1,8 и 1,3 раза, в почках – в 1,4 (10 и 25 мг/кг) и 1,6 раза (15 мг/кг), в сыворотке крови – в 1,7, 1,2 и 1,8 раза, в сердце – в 1,4, 1,7 и 1,6 раза по сравнению с группой животных с патологией. Стоит также отметить, что при введении препарата сравнения в дозе 15 мг/кг крысам с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом, величина $tg\alpha_2$ снижалась в печени и сердце в 1,2 раза, в почках и сыворотке крови – в 1,3 раза относительно данных при патологии (табл. 11-14).

Кроме того, происходило снижение $tg\alpha_2$ при введении исследуемых бигуанидиновых производных на фоне использования стрептозоциновой модели развития гипергликемии у крыс (табл. 11-14). Так, при действии НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг наблюдалось снижение значений данного параметра в печени крыс – в 1,6 и 1,3 раза, в почках – в 2,0 и 1,8 раза, в сердце – в 1,5 и 1,4 раза и в сыворотке крови – в 1,6 и 1,5 раза соответственно. Это, вероятно, может быть связано с уменьшением степени мобилизации АОС в условиях торможения свободнорадикальных процессов.

Параметры биохемилюминесценции в печени крыс при гипергликемии и введении бигуанидиновых производных

Группы животных	Исследуемые параметры		
	I_{\max} , мВ	S, мВ*с	$tg\alpha_2$
1. Контроль	42,01±1,32	92,31±4,62	8,12±0,41
2. Гипергликемия, индуцированная протамина-сульфатом	86,67±3,50*	236,08±11,80*	16,65±0,83*
3. Введение крысам с патологией метформина (15 мг/кг)	70,41±3,52**	145,94±7,30**	14,95±0,75**
4. Введение крысам с патологией НИПМГ (10 мг/кг)	45,74±2,29**	114,18±5,71**	8,16±0,41**
5. Введение крысам с патологией НИПМГ (15 мг/кг)	63,03±3,15**	93,86±4,69**	8,87±0,44**
6. Введение крысам с патологией НИПМГ (25 мг/кг)	56,17±2,81**	139,00±6,95**	11,75±0,59**
7. Введение крысам с патологией ДКБ (10 мг/кг)	51,30±2,57**	152,21±7,61**	8,94±0,45**
8. Введение крысам с патологией ДКБ (15 мг/кг)	69,85±3,49**	162,00±8,10**	9,19±0,46**
9. Введение крысам с патологией ДКБ (25 мг/кг)	68,00±3,40**	165,17±8,26**	13,04±0,65**
10. Гипергликемия, индуцированная стрептозоцином	109,34±5,47*	236,78±11,84*	20,43±1,02*
11. Введение крысам с патологией НИПМГ (15 мг/кг)	67,38±3,37***	161,17±8,06***	12,83±0,64***
12. Введение крысам с патологией ДКБ (15 мг/кг)	91,98±4,60***	191,90±9,60***	15,79±0,79***

Параметры биохемилюминесценции в почках крыс при гипергликемии и введении бигуанидиновых производных

Группы животных	Исследуемые параметры		
	I_{\max} , мВ	S, мВ*с	$tg\alpha_2$
1. Контроль	36,22±1,81	138,19±6,91	8,29±0,41
2. Гипергликемия, индуцированная протамина-сульфатом	81,91±4,10*	259,21±12,96*	14,80±0,74*
3. Введение крысам с патологией метформина (15 мг/кг)	44,57±2,23**	178,25±8,91**	11,49±0,57**
4. Введение крысам с патологией НИПМГ (10 мг/кг)	46,12±2,31**	155,80±7,79**	10,92±0,55**
5. Введение крысам с патологией НИПМГ (15 мг/кг)	43,69±2,18**	171,92±8,60**	9,45±0,47**
6. Введение крысам с патологией НИПМГ (25 мг/кг)	41,03±2,05**	189,33±9,47**	8,46±0,42**
7. Введение крысам с патологией ДКБ (10 мг/кг)	46,46±2,32**	163,46±8,17**	10,57±0,53**
8. Введение крысам с патологией ДКБ (15 мг/кг)	54,00±2,70**	202,50±10,13**	9,37±0,47**
9. Введение крысам с патологией ДКБ (25 мг/кг)	51,83±2,59**	188,43±9,42**	10,95±0,55**
10. Гипергликемия, индуцированная стрептозоцином	108,60±5,43*	331,52±16,58*	19,92±1,00*
11. Введение крысам с патологией НИПМГ (15 мг/кг)	51,06±2,55***	170,14±8,51***	10,00±0,50***
12. Введение крысам с патологией ДКБ (15 мг/кг)	60,69±3,03***	194,95±9,75***	11,18±0,56***

Параметры биохемилюминесценции в сыворотке крови крыс при гипергликемии и введении бигуанидиновых производных

Группы животных	Исследуемые параметры		
	I_{\max} , мВ	S, мВ*с	$tg\alpha_2$
1. Контроль	25,20±1,26	307,71±15,39	13,33±0,67
2. Гипергликемия, индуцированная протамина-сульфатом	51,15±2,56*	739,76±36,99*	29,48±1,47*
3. Введение крысам с патологией метформина (15 мг/кг)	37,45±1,87**	428,12±21,41**	23,22±1,16**
4. Введение крысам с патологией НИПМГ (10 мг/кг)	29,74±1,49**	395,68±19,78**	14,14±0,71**
5. Введение крысам с патологией НИПМГ (15 мг/кг)	38,62±1,93**	332,36±16,62**	22,90±1,15**
6. Введение крысам с патологией НИПМГ (25 мг/кг)	43,14±2,16**	328,17±16,41**	20,29±1,01**
7. Введение крысам с патологией ДКБ (10 мг/кг)	31,77±1,59**	438,43±21,92**	17,05±0,85**
8. Введение крысам с патологией ДКБ (15 мг/кг)	40,23±2,01**	567,19±28,36**	23,95±1,20**
9. Введение крысам с патологией ДКБ (25 мг/кг)	42,61±2,13**	599,89±29,99**	16,59±0,83**
10. Гипергликемия, индуцированная стрептозоцином	52,23±2,61*	654,14±32,71*	30,44±1,52*
11. Введение крысам с патологией НИПМГ (15 мг/кг)	26,22±1,31***	332,97±16,65***	18,83±0,94***
12. Введение крысам с патологией ДКБ (15 мг/кг)	39,83±1,99***	540,50±27,03***	20,25±1,01***

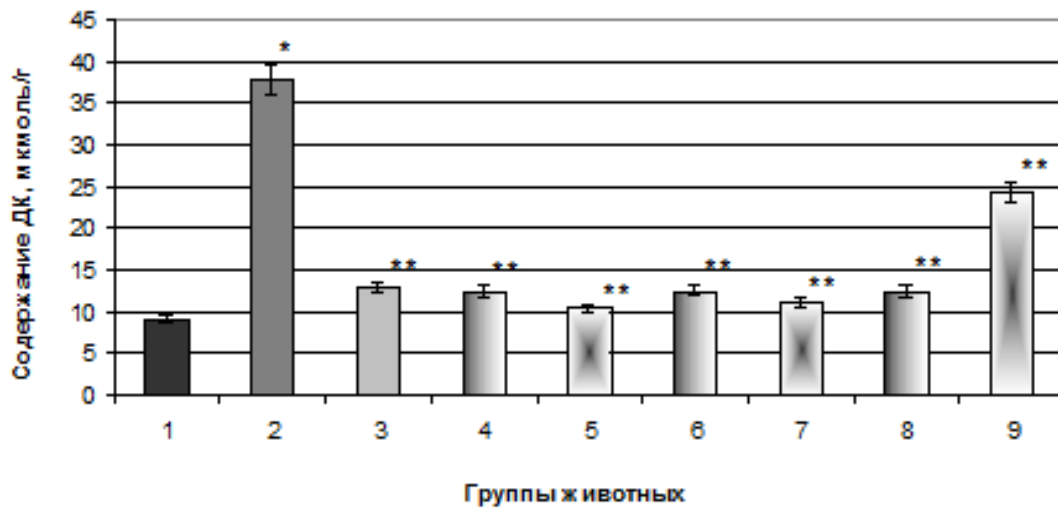
Параметры биофлуориметрии в сердце крыс при гипергликемии и введении бигуанидиновых производных

Группы животных	Исследуемые параметры		
	I_{\max} , мВ	S, мВ*с	$tg\alpha_2$
1. Контроль	51,53±2,58	485,01±24,25	7,10±0,36
2. Гипергликемия, индуцированная протамин-сульфатом	133,41±6,67*	1119,25±55,96*	13,23±0,66*
3. Введение крысам с патологией метформина (15 мг/кг)	119,50±5,98**	659,19±32,96**	10,97±0,55**
4. Введение крысам с патологией НИПМГ (10 мг/кг)	55,52±2,78**	503,24±25,16**	7,80±0,39**
5. Введение крысам с патологией НИПМГ (15 мг/кг)	53,69±2,68**	498,90±24,95**	7,38±0,37**
6. Введение крысам с патологией НИПМГ (25 мг/кг)	61,67±3,08**	779,42±38,97**	7,21±0,36**
7. Введение крысам с патологией ДКБ (10 мг/кг)	70,50±3,53**	818,71±40,94**	11,60±0,58**
8. Введение крысам с патологией ДКБ (15 мг/кг)	55,73±2,79**	678,08±33,90**	7,80±0,39**
9. Введение крысам с патологией ДКБ (25 мг/кг)	105,22±5,26**	864,78±43,24**	10,07±0,50**
10. Гипергликемия, индуцированная стрептозоцином	126,93±6,35*	1062,76±53,14*	14,94±0,75*
11. Введение крысам с патологией НИПМГ (15 мг/кг)	79,87±3,99***	522,17±26,11***	9,66±0,48***
12. Введение крысам с патологией ДКБ (15 мг/кг)	73,50±3,68***	696,17±34,81***	12,06±0,60***

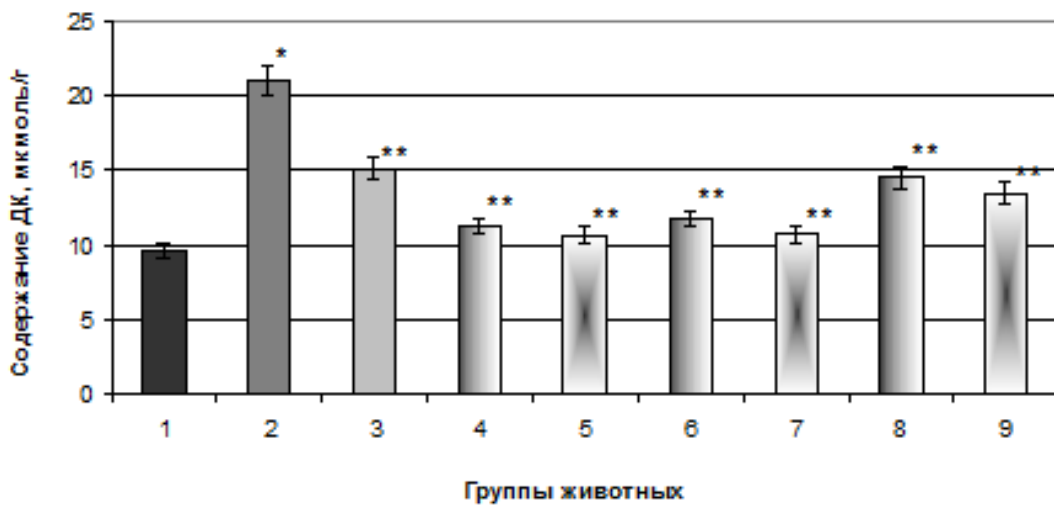
В табл. 9-12 различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно показателей при гипергликемии, индуцированной протамин-сульфатом, *** - относительно показателей при гипергликемии, индуцированной стрептозоцином

Известно, что в условиях гипергликемии происходит интенсификация процессов ПОЛ, приводящая к возрастанию количества продуктов СО биомолекул, оказывающих токсическое влияние на клеточные структуры. В этой связи, нами была проведена оценка уровня первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК) (рис. 9-10). Так, при развитии гипергликемии, вызванной введением стрептозоцина, их содержание в тканях крыс увеличилось в печени в 2,9 раза, в почках – в 3,1 раза, в сыворотке крови – в 3,3 раза и в сердце – в 2,4 раза (рис. 10). При применении протамин-сульфатной модели для индукции гипергликемии были получены подобные результаты (рис. 9).

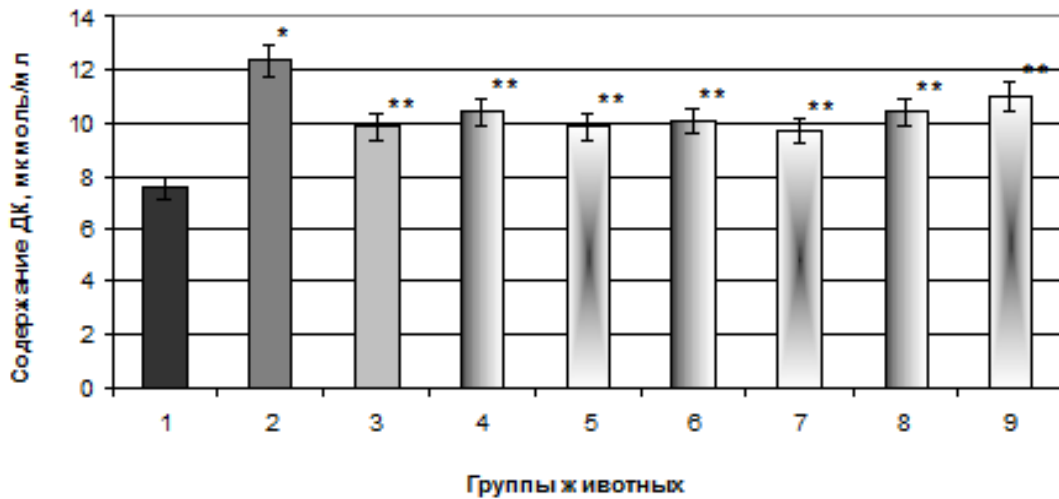
Введение метформина, НИПМГ и ДКБ животным с патологией, вызванной введением протамин-сульфата, приводило к снижению уровня первичных продуктов ПОЛ (рис. 9). Так, применение НИПМГ и ДКБ в дозе 10 мг/кг понижало содержание ДК в печени в 1,8 и 1,5 раза, в почках - в 1,9 и 2,0 раза, в сыворотке крови – в 1,2 и 1,3 раза, в сердце – в 2,1 и 2,6 раза. Введение метформина, НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг снижало уровень ДК, изменяя в сторону контроля, в печени – в 2,9, 3,0 и 3,4 раза, в почках – в 1,4, 1,8 и 2,0 раза, в сыворотке крови – в 1,3 (метформин, ДКБ) и 1,2 раза (НИПМГ) и в сердце – в 1,8, 2,3 и 2,1 раза. Изменения значений исследуемого параметра при действии бигуанидов в дозе 25 мг/кг носили следующий характер: в печени наблюдалось снижение в 3,1 и 1,6 раза, в почках – в 1,5 и 1,6 раза, в сыворотке крови – в 1,2 и 1,1 раза и в сердце – в 1,9 и 1,4 раза соответственно относительно данных, полученных при патологии.



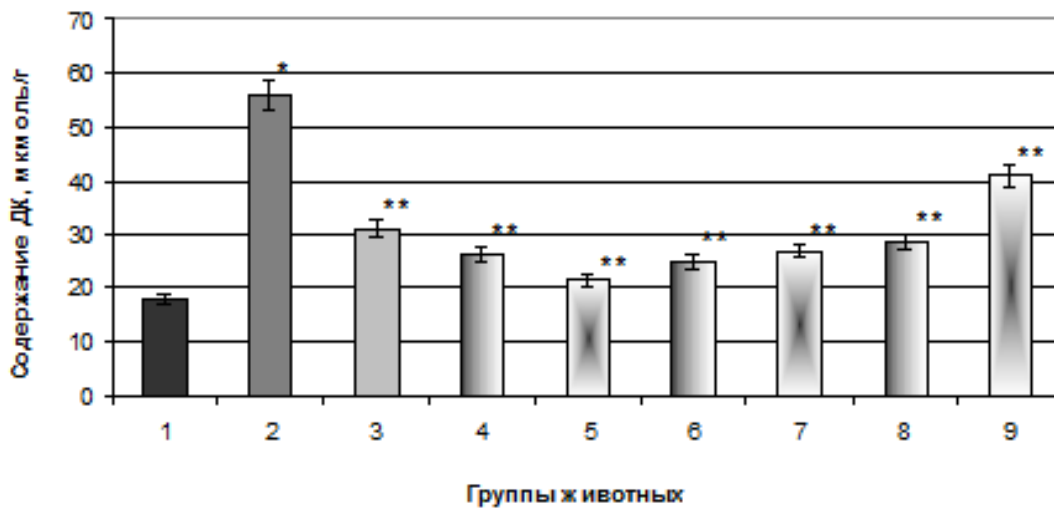
А



Б



В



Г

Рис. 9. Содержание диеновых конъюгатов в печени (А), в почках (Б), в сыворотке крови (В), в сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии

При реализации стрептозоциновой модели индукции гипергликемии введение бигуанидиновых производных - НИПМГ и ДКБ, в дозе 15 мг/кг приводило к снижению ДК в печени в 2,6 и 2,4 раза, почках – в 2,6 и 2,0 раза, в сыворотке крови - в 2,6 и 2,2 раза и в сердце – в 1,8 и 1,7 раза соответственно (рис. 10).

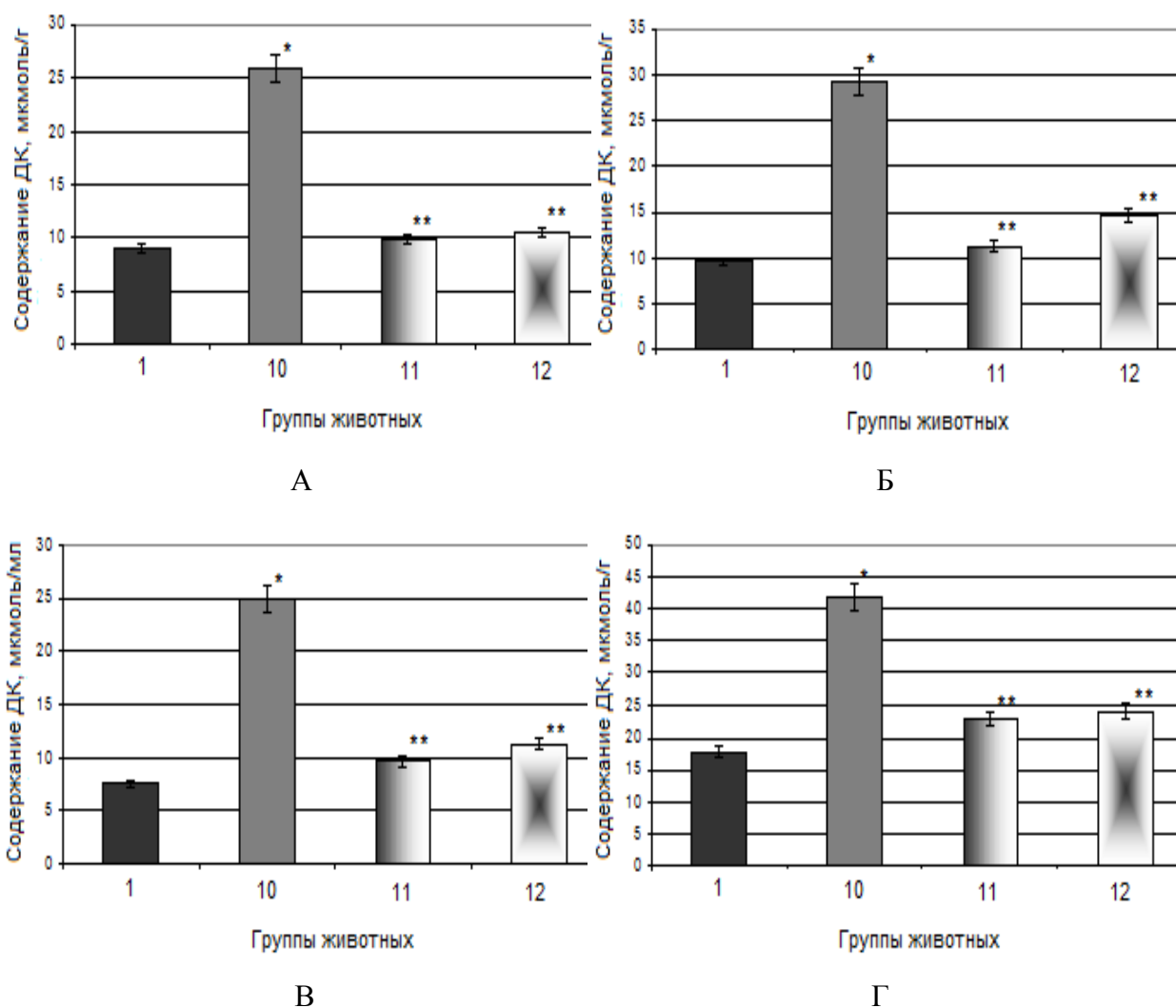


Рис. 10. Содержание диеновых конъюгатов в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

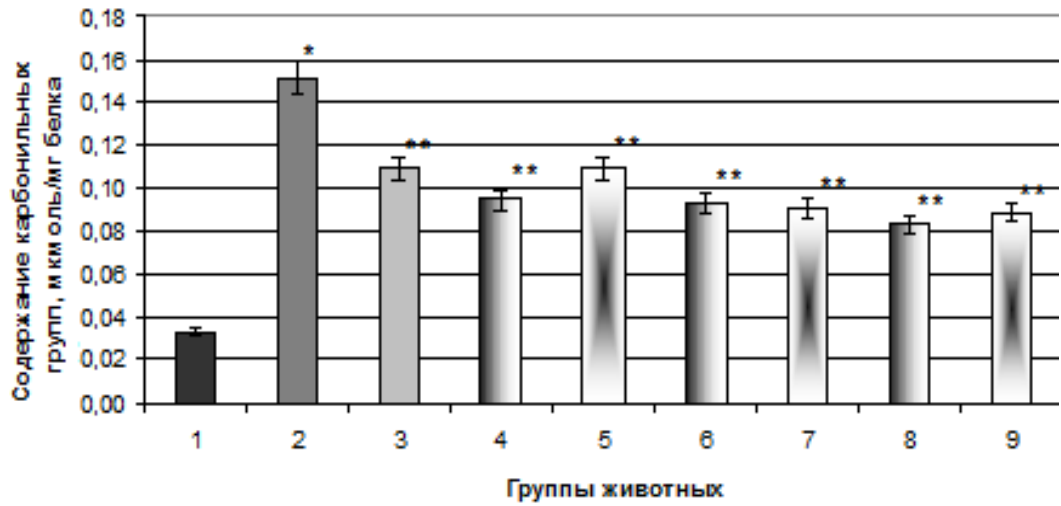
Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии

3.4.2. Окислительная модификация белков в тканях и сыворотке крови крыс с гипергликемией при введении N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина и 1,3-диметил 5-[(карбамимидаметанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата

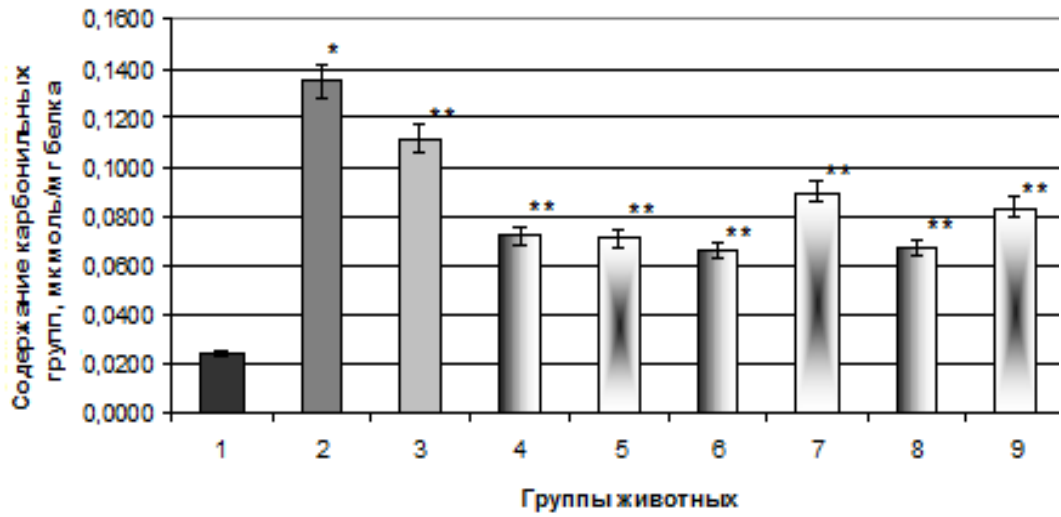
Как известно, одним из наиболее ранних и надёжных индикаторов поражений тканей при интенсификации СО является уровень ОМБ [21, 191]. Окислительное повреждение белков представляет собой цепной процесс, в ходе которого гидроксипроизводное белка, образовавшееся при взаимодействии АФК с аминокислотами

, распадается на карбонильные фрагменты, которые рассматриваются как маркеры ОМБ. В ходе наших исследований установлено, что при гипергликемии, индуцированной протамин-сульфатом, содержание карбонильных соединений в печени крыс увеличивается в 4,6 раза, в почках – в 5,7 раза, в сыворотке крови – в 6,9 раза и в сердце – в 2,6 раза по сравнению с контрольной группой (рис. 11). Возрастание степени ОМБ у крыс было выявлено также и при реализации стрептозоциновой модели гипергликемии: в печени – в 3,4 раза, в почках – в 6,4 раза, в сыворотке крови – в 3,3 раза и в сердце в 2,7 раза (рис. 12). Полученные результаты согласуются с литературными данными, указывающими, что основными индукторами ОМБ выступает увеличение уровня АФК, продуктов ПОЛ. При действии АФК происходит нарушение нативной конформации белков с образованием крупных белковых агрегатов или фрагментация белковой молекулы. OH^\bullet чаще всего вызывает агрегацию белков, но совместно с $\text{O}_2^{\bullet-}$ приводит к фрагментации с образованием низкомолекулярных фрагментов [51, 154]. Под действием СР происходит нарушение нативной конформации ряда доменов белков. В результате увеличивается число гидрофобных остатков на поверхности глобул, что и обуславливает формирование крупных белковых конгломератов [106, 122].

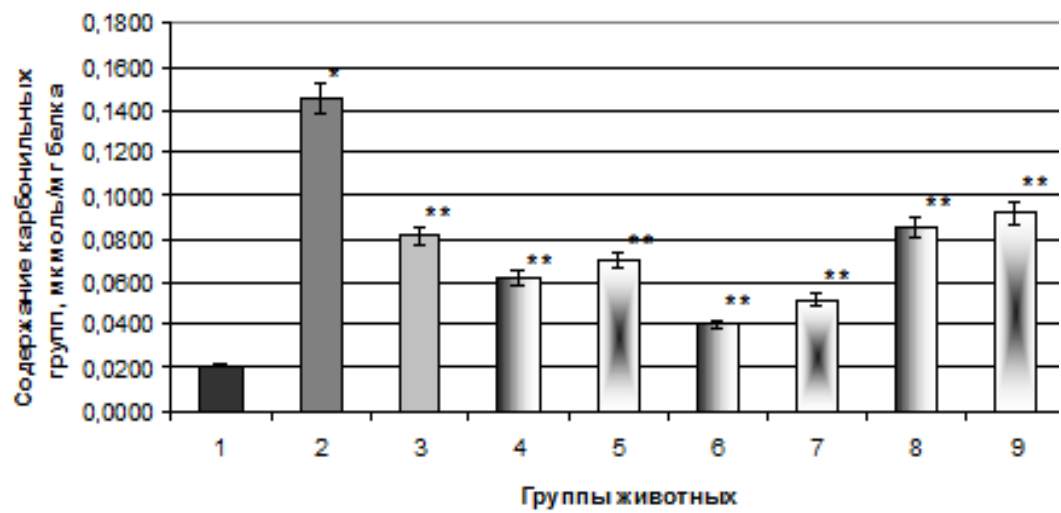
При введении НИПМГ и ДКБ в дозе 10 мг/кг экспериментальным животным с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом, содержание карбонильных групп уменьшалось в печени в 1,6 и 1,4 раза, в почках – в 1,9 раза, в сыворотке крови – в 2,4 раза и в сердце - в 1,7 и 1,2 раза соответственно относительно данных при патологии (рис. 11). При введении препарата сравнения и исследуемых бигуанидов в дозе 15 мг/кг животным с патологией, развивающейся в результате воздействия протамин-сульфата, концентрация продуктов ОМБ снижалась в печени – в 1,4, 1,6 и 1,7 раза, в почках – в 1,2, 2,1 и 1,5 раза, в сыворотке крови – в 1,8, 3,6 и 2,8 раза и в сердце – в 1,4, 1,6 и 2,0 раза относительно данных у крыс при гипергликемии (рис. 11). В дозе 25 мг/кг действие НИПМГ и ДКБ на содержание карбонильных групп у экспериментальных животных с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом, проявлялось следующим образом: в печени выявлено их снижение в 1,8 и 1,7 раза, в почках – в 2,0 и 1,6 раза, в сыворотке крови – в 1,7 и 1,6 раза и в сердце – в 1,9 раза и в том, и в другом случае, соответственно (рис. 11).



А



Б



В

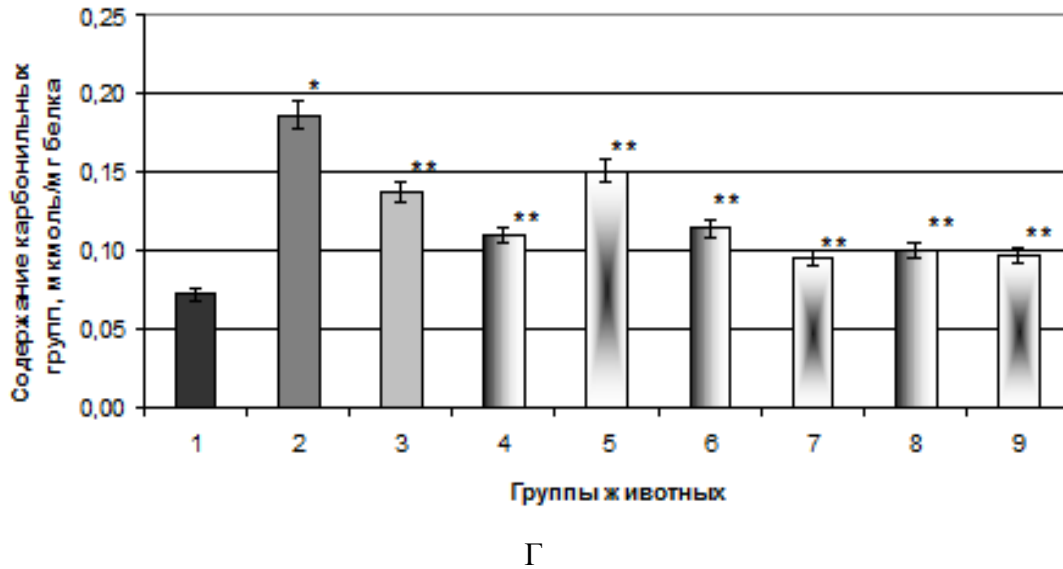
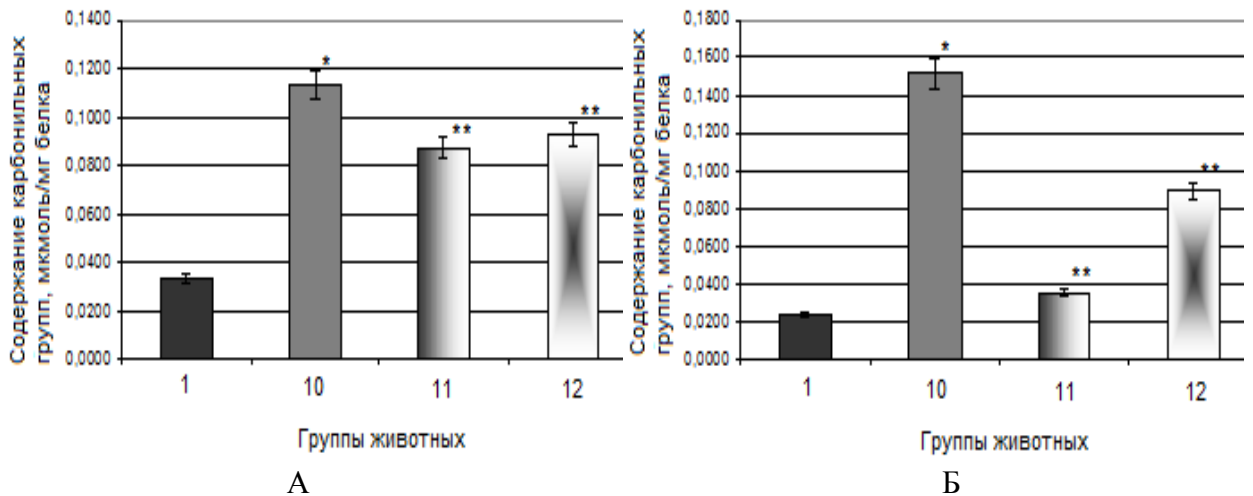


Рис. 11. Содержание продуктов окислительной модификации белков в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии

При действии НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг на фоне развития гипергликемии, вызванной введением стрептозоцина, содержание карбонильных групп также изменялось в направлении контроля: в печени данный показатель уменьшался в 1,3 и 1,2 раза, в почках – в 4,3 и 1,7 раза, в сыворотке крови – в 2,4 и 1,4 раза и в сердце крыс – в 1,8 и 1,3 раза (рис. 12).



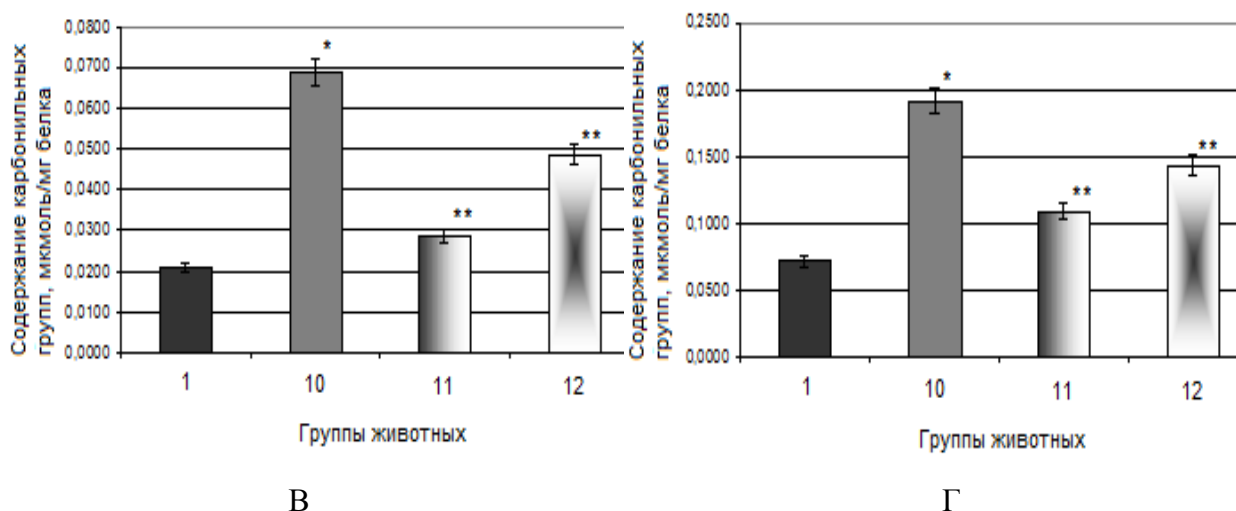


Рис. 12. Содержание продуктов окислительной модификации белков в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

*Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии*

Следует отметить, что при сравнительном анализе действия тестируемых синтетических бигуанидиновых производных в разных тканях крыс были получены различные данные. Так, например, при анализе уровня ДК в печени и сердце экспериментальных животных для ДКБ были отмечены более выраженные изменения исследуемого параметра, чем для НИПМГ. Однако на содержание продуктов ОМБ в печени животных более выраженное воздействие оказывал НИПМГ. По-видимому, это может быть связано с особенностями метаболизма данных тканей в условиях развития оксидативного стресса на фоне гипергликемии. Таким образом, в разных тканях для эффективности действия НИПМГ и ДКБ были характерны некоторые различия.

3.4.3. Оценка степени фрагментации ДНК в тканях крыс с гипергликемией при введении бигуанидиновых производных

Поскольку активные метаболиты кислорода способны разрушать генетический аппарат клеток, способствуя появлению разрывов ДНК, ее деградации и потери клеткой части генетического материала, было проведено выделение ДНК из клеток печени, почек и сердца животных с экспериментальной гипергликемией и животных, которым на фоне патологического состояния вводили бигуанидиновые производные, с последующим

электрофорезом полученных образцов в агарозном геле. Выявлено, что при развитии гипергликемии, индуцированной введением как протамин-сульфата, так и стрептозоцина, у крыс наблюдалась фрагментация ДНК из печени, почек и сердца в отличие от ДНК, полученной из тканей животных контрольной группы, которая была представлена одним фрагментом в начале трека (рис. 13-15). Причем наблюдаемые фрагменты ДНК образовывали характерную «апоптозную лестницу» вследствие работы апоптоз-специфических нуклеаз [175]. Из литературных источников известно, что врожденный гиперинсулинизм, вызванный мутацией глюкокиназы, ассоциирован с апоптозом β -клеток поджелудочной железы [162]. Следует отметить, что в других тканях генетически измененная активность глюкокиназы повышает активность супрессорного белка p53, из чего можно сделать вывод, что повреждение ДНК и измененная активность белка p53 играют важную роль в гиперинсулинемии и гипергликемии при СД2 [210].

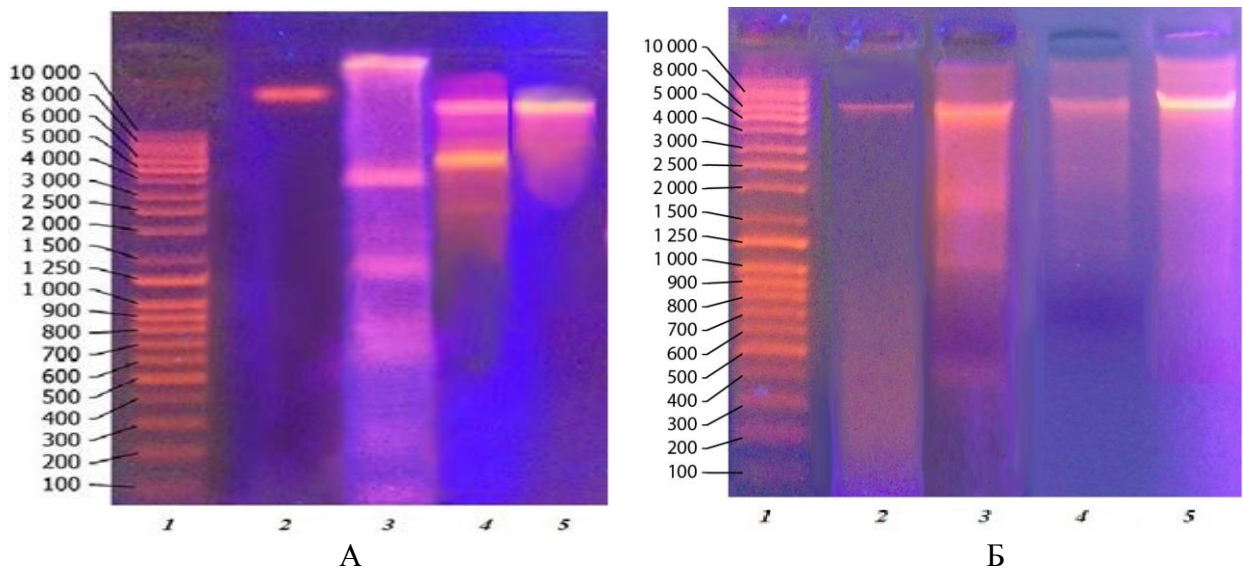


Рис. 13. Электрофореграмма препаратов ДНК из печени крыс

1 – маркеры молекулярной массы, 2 – контроль, 3 – экспериментальная гипергликемия, индуцированная протамин-сульфатом (А) и стрептозоцином (Б), 4 – введение на фоне развития патологии НИПМГ в дозе 15 мг/кг, 5 – введение на фоне развития патологии ДКБ в дозе 15 мг/кг

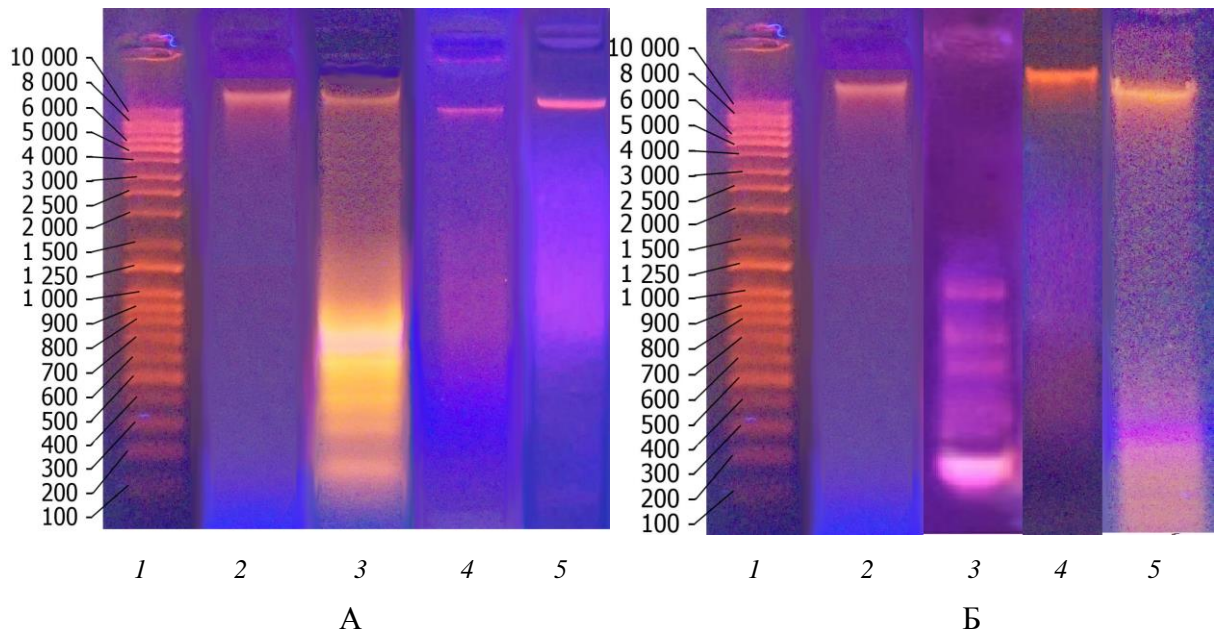


Рис. 14. Электрофореграмма препаратов ДНК из почек крыс

1 – маркеры молекулярной массы, 2 – контроль, 3 – экспериментальная гипергликемия, индуцированная протамин-сульфатом (А) и стрептозоцином (Б), 4 – введение на фоне развития патологии НИПМГ в дозе 15 мг/кг, 5 – введение на фоне развития патологии ДКБ в дозе 15 мг/кг

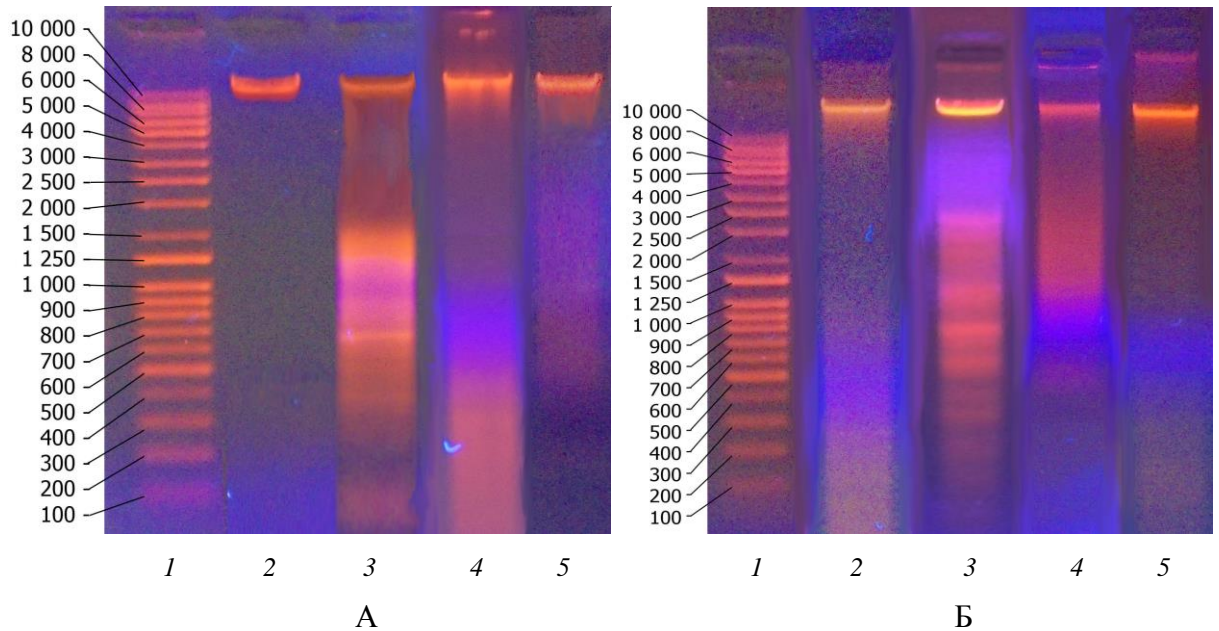


Рис. 15. Электрофореграмма препаратов ДНК из сердца крыс

1 – маркеры молекулярной массы, 2 – контроль, 3 – экспериментальная гипергликемия, индуцированная протамин-сульфатом (А) и стрептозоцином (Б), 4 – введение на фоне развития патологии НИПМГ в дозе 15 мг/кг, 5 – введение на фоне развития патологии ДКБ в дозе 15 мг/кг

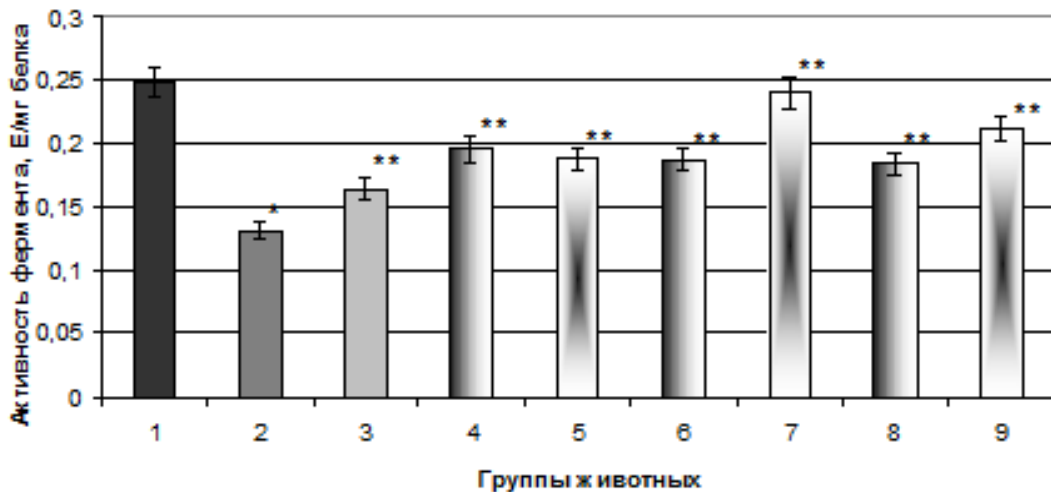
Данные об изменениях уровня ДК и ОМБ у крыс с гипергликемией, которым вводили НИПМГ и ДКБ, соотносятся с результатами оценки степени фрагментации ДНК. В ходе анализа электрофореграммы образцов ДНК из печеночной, почечной и сердечной ткани крыс установлено, что введение исследуемых бигуанидов крысам с экспериментальной гипергликемией способствует существенному снижению степени фрагментации ДНК, возникающей при патологии (рис. 13-15). Как известно, метформин реализует свои свойства через активацию АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК), угнетение активности которой наблюдается при метаболическом синдроме, СД и раке [92, 163, 169]. В свою очередь, АМФК регулирует экспрессию белка p53. Таким образом, метформин предотвращает апоптоз клеток инсулинового аппарата, по-видимому, через снижение экспрессии белка p53, что указывает на способность бигуанидиновых производных оказывать антиапоптотический эффект [82].

3.4.4. Воздействие бигуанидиновых производных на активность аконитатгидратазы и уровень цитрата в тканях и сыворотке крови крыс при развитии гипергликемии

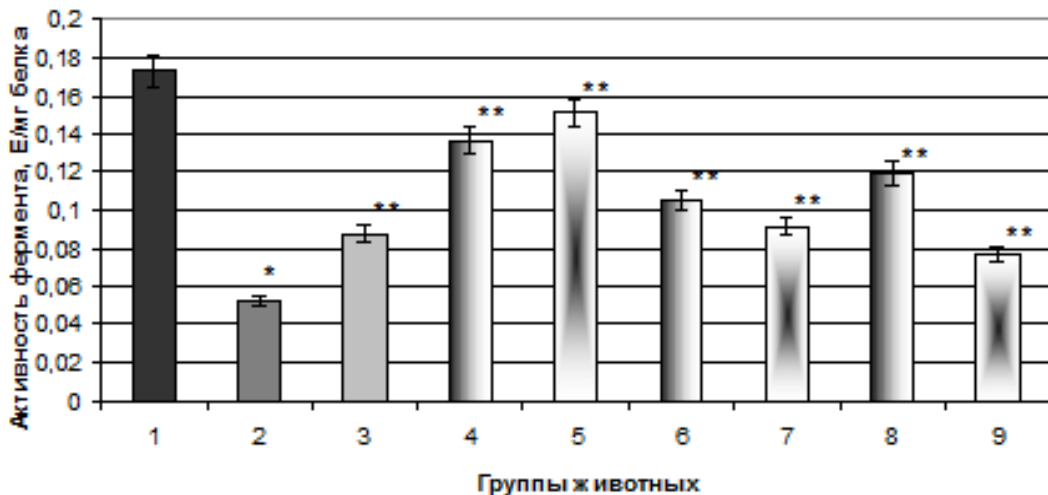
Результаты проведенных исследований показали, что при гипергликемии у крыс происходило снижение активности АГ относительно контроля (рис. 16-17). Так, в печени животных с патологией на фоне введения стрептозоцина удельная активность АГ уменьшалась в 2,2 раза, в почках – в 1,7 раза, в сыворотке крови – в 2,3 раза и в сердце – в 1,9 раза (рис. 17). Активность фермента, выраженная в Е/г сырой массы печени, почек и сердца и в Е/мл сыворотки крови изменялась при этом сходным образом: снижалась в 1,9, 1,3, 1,6 и 1,8 раза соответственно (рис. 2 приложения). Известно, что в условиях ОС при гипергликемии супероксидный анион-радикал способен подавлять активность АГ, что позволяет рассматривать данный фермент в качестве чувствительной и критической мишени действия АФК [42]. В зависимости от продолжительности ОС АГ может обратимо ингибироваться вследствие окисления остатков цистеина, что может быть взаимосвязано с взаимодействием АГ с митохондриальным железом-связывающим белком фратаксином. Дальнейшая необратимая инактивация фермента происходит вследствие разборки $[4Fe-4S]^{2+}$ кластера, карбонилирования и АТФ-зависимой деградации [174].

При действии исследуемых бигуанидов активность АГ частично восстанавливалась. Так, на фоне индукции гипергликемии протамин-сульфатом, воздействие НИПМГ в дозе 10 мг/кг увеличивало удельную активность АГ в печени, почках, сыворотке крови и сердце соответственно в 1,5, 2,6, 2,3 и 2,7 раза; при действии НИПМГ в дозе 15 мг/кг – в 1,4, 2,0, 2,2 и 2,6 раза; в дозе 25 мг/кг – в 1,4 (в печени и

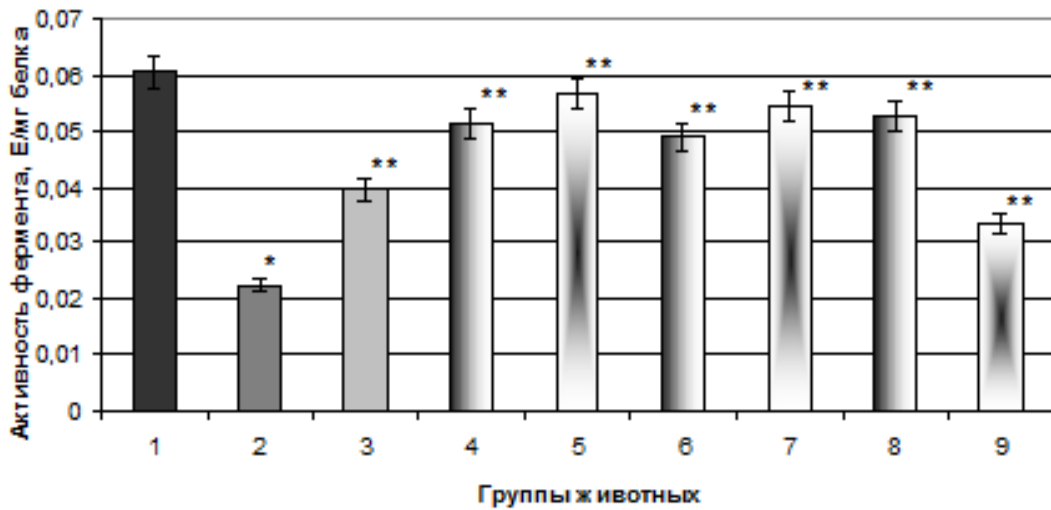
сердце), 2,3 (в почках) и 2,4 раза (в сыворотке крови) (рис. 16). Введение животным с гипегликемией ДКБ в дозах 10 и 15 мг/кг сопровождалось наибольшим положительным эффектом: удельная активность АГ возрастала в печени в 1,4 и 1,8 раза, в почках – в 2,9 и 1,8 раза, в сыворотке крови – в 2,5 и 2,4 раза и в сердце – в 3,0 и 3,3 раза по сравнению с уровнем при патологии (рис. 16). Введение метформина крысам с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом, приводило к возрастанию удельной активности АГ в печени в 1,3 раза, в почках – в 1,7 раза, в сыворотке крови – в 1,8 раза и в сердце – в 2,0 раза относительно значений при патологии (рис.16). При действии ДКБ в дозе 25 мг/кг удельная активность фермента возрастала, изменяясь в сторону контроля, в печени в 1,6 раза, в почках и сыворотке крови - в 1,5 раза; в сердце – достоверных изменений активности АГ выявлено не было (рис. 16). Влияние бигуанидиновых производных на активность фермента, выраженную в виде Е/г сырой массы исследуемых тканей и в Е/мл сыворотки крови, на фоне гипергликемии, вызванной протамин-сульфатом имело сходную тенденцию (рис. 1 приложения).



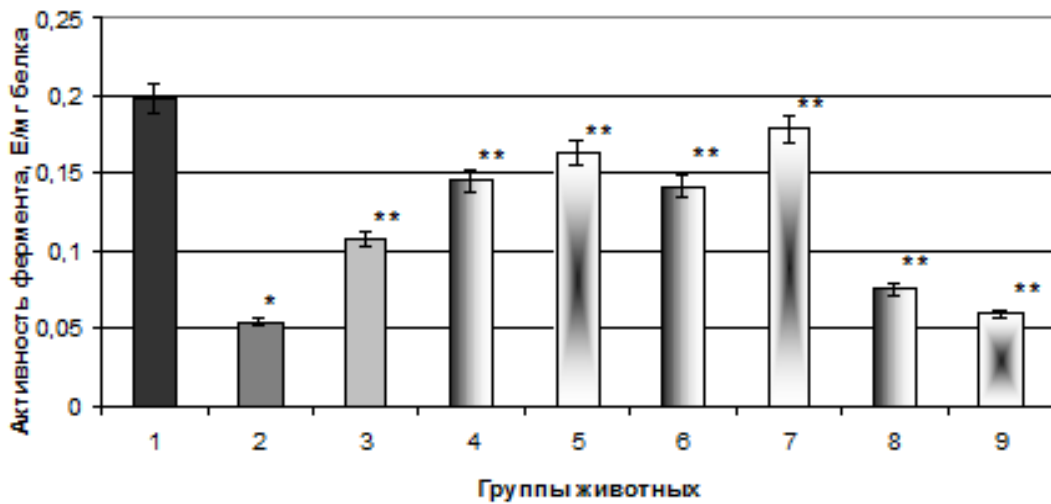
А



Б



В



Г

Рис. 16. Удельная активность аконитатгидратазы в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии

Сходная тенденция действия бигуанидиновых производных на активность АГ была отмечена и при гипергликемии, вызванной введением стрептозоцина. Так, при введении НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг удельная активность фермента возрастала в печени в 1,9 и 1,4 раза, в почках – в 1,3 и 1,4 раза, в сыворотке крови - в 1,8 и 1,5 раза и в сердце - в 1,7 и 1,5 раза соответственно (рис. 17). При этом активность, выраженная в Е/г сырой массы

печени, возростала в 1,7 и 1,2 раза, почек – в 1,2 раза и в том и в другом случае, сердца – в 1,4 и 1,2 раза относительно данных при патологии. Что касается активности АГ, выраженной в Е/мл сыворотки крови, то воздействие НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг приводило к ее возрастанию в 1,8 и 1,5 раза соответственно (рис. 2 приложения). Изменение активности АГ в сторону нормы при введении бигуанидиновых производных животным с гипергликемией, очевидно, связано с реконструкцией активного центра данного фермента вследствие снижения уровня ОС.

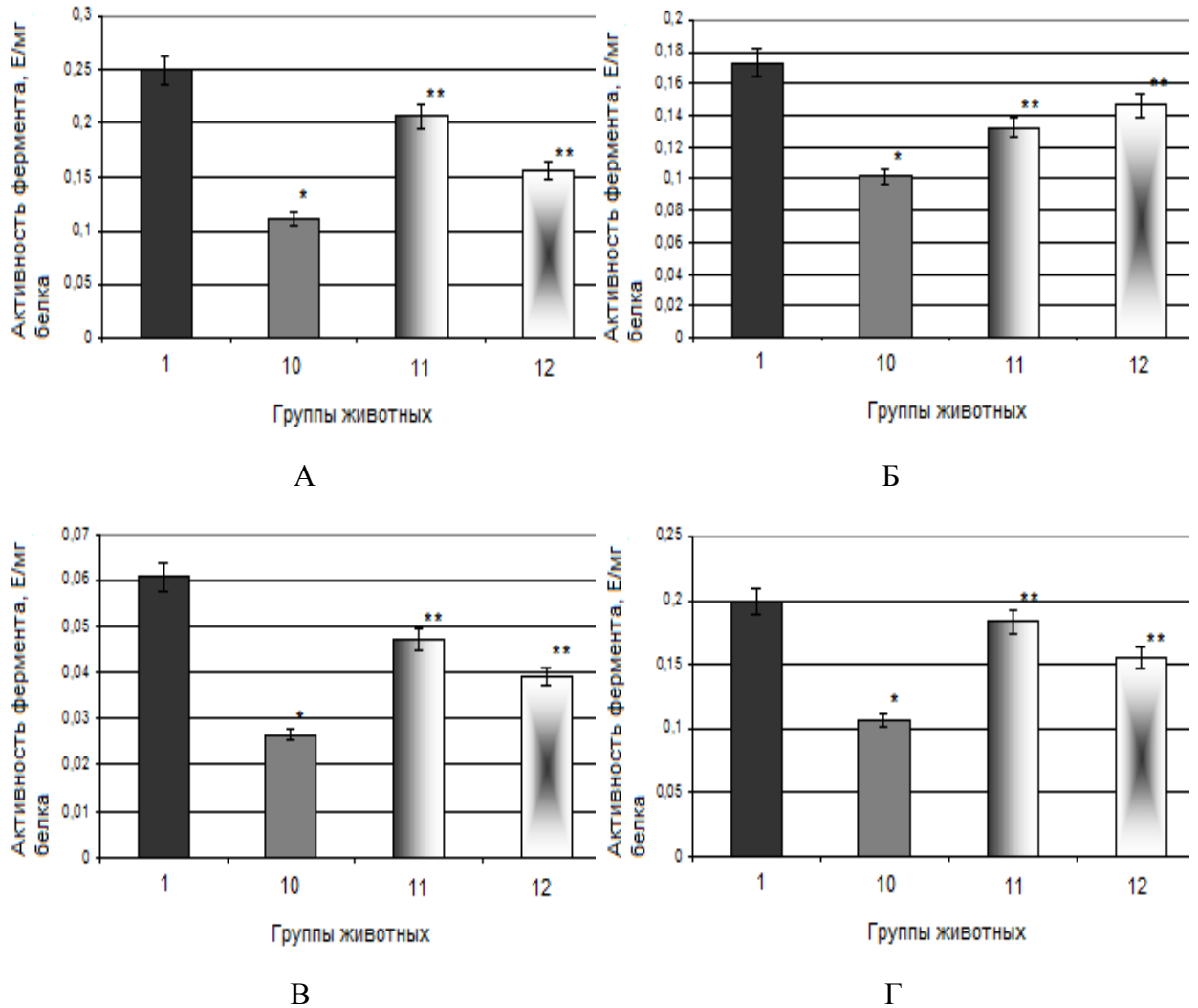
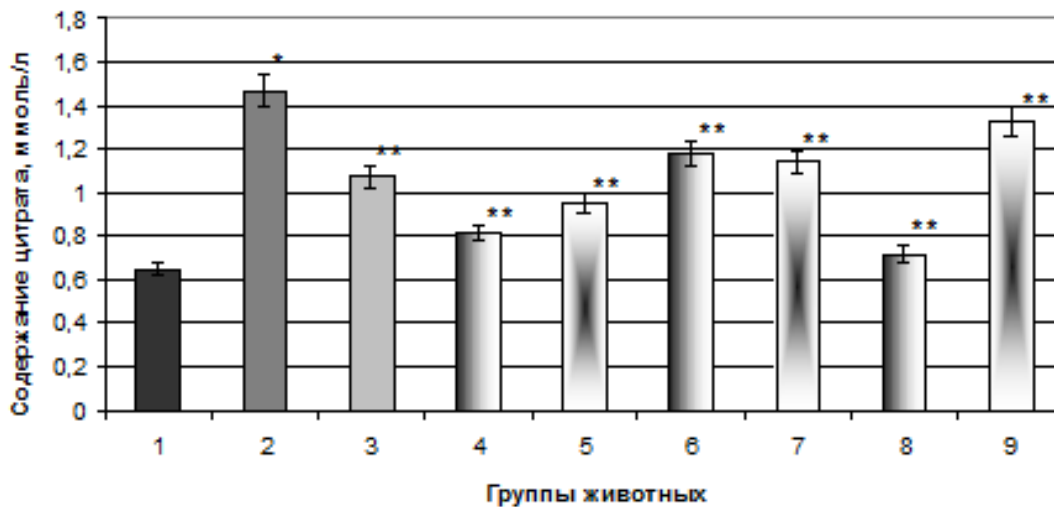


Рис. 17. Удельная активность аконитатгидратазы в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

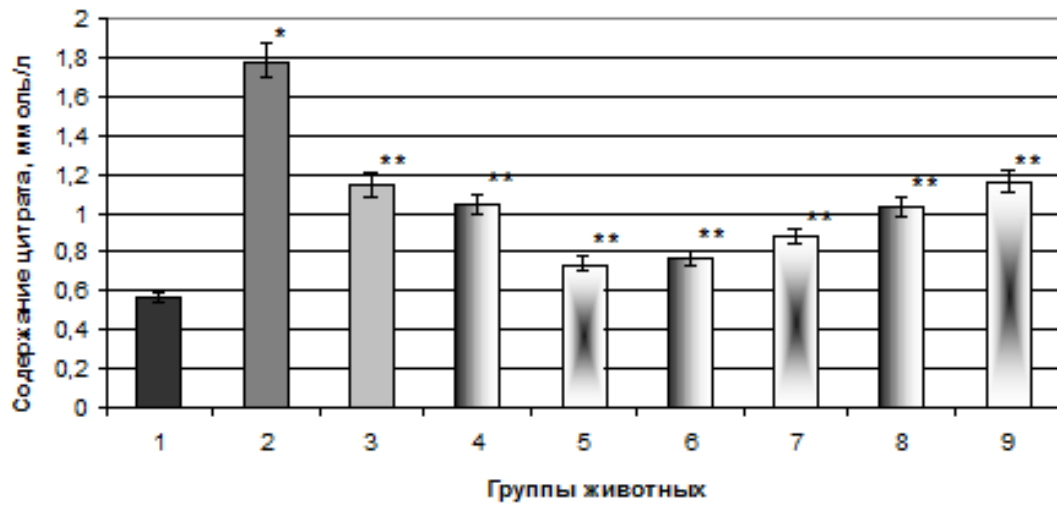
Различия достоверны при $p < 0,05$ * - относительно контроля, ** - относительно патологии

В условиях угнетения активности АГ при интенсификации ОС при гипергликемическом патогенезе наблюдается повышение концентрации цитрата, являющегося низкомолекулярным антиоксидантом из-за способности хелатировать ионы Fe^{2+} , которые, как известно, обладают прооксидантной активностью (рис. 18-19) [73, 89]. У крыс с гипергликемией, вызванной введением стрептозоцина, содержание цитрата возрастало в 2,1 раза в печени и сердце, в 2,7 раза в почках и в 2,5 раза в сыворотке крови (рис. 19). Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что при различных патологических состояниях, сопряженных с ОС, происходит нарушение утилизации цитрата [54, 208].

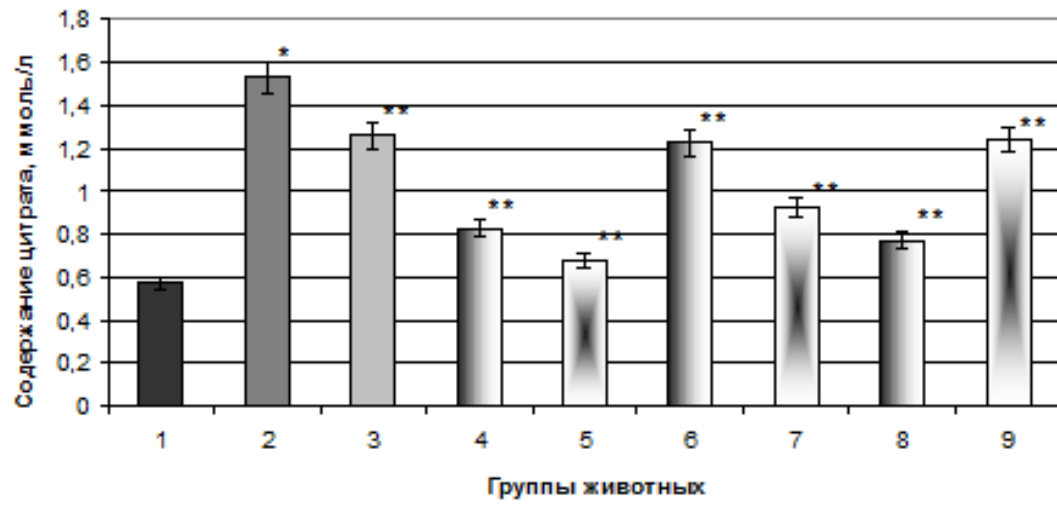
При введении метформина, НИПМГ и ДКБ животным с патологией, вызванной введением протамина-сульфата, наблюдалось снижение содержания цитрата, причем самым эффективно действующим в почках, сыворотке крови и в сердце оказался бигуанид ДКБ в дозе 10 мг/кг: содержание цитрата снижалось в 2,4, 2,2 и 1,4 раза соответственно по сравнению с его количеством при патологии (рис. 18). Что касается изменений в печени, то наиболее эффективной была доза ДКБ 25 мг/кг – содержание цитрата у крыс с гипергликемией снижалось в 2,0 раза (рис. 18). Менее эффективным в этой ткани оказался бигуанид НИПМГ в дозе 10 мг/кг: его введение снижало значение данного параметра в 1,8 раза относительно данных при гипергликемии. Действие препарата сравнения на содержание цитрата у крыс при гипергликемии, вызванной введением протамина-сульфата, имело следующий характер: в печени его концентрация уменьшилась в 1,4 раза, в почках – в 1,6 раза, в сыворотке крови – в 1,2 раза и в сердце – в 1,3 раза, изменяясь в сторону контроля (рис. 18).



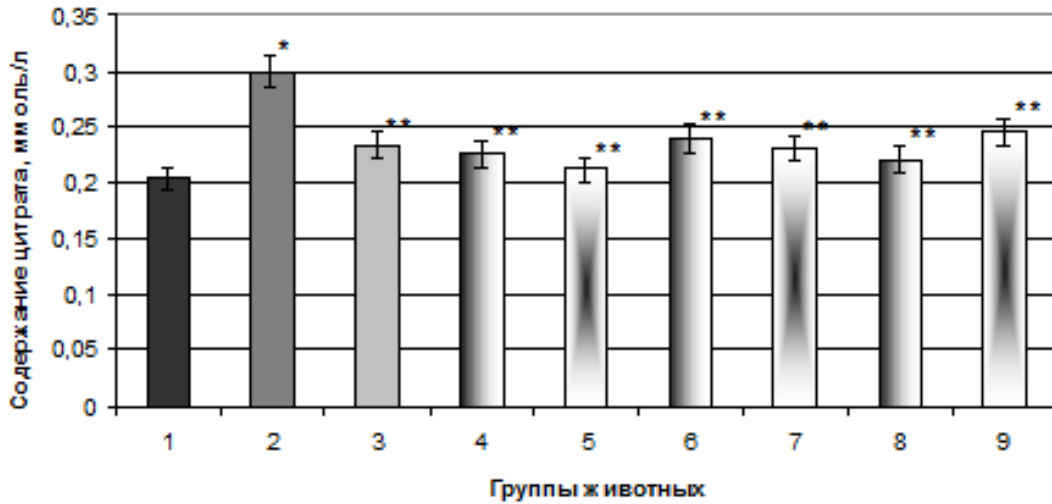
А



Б



В

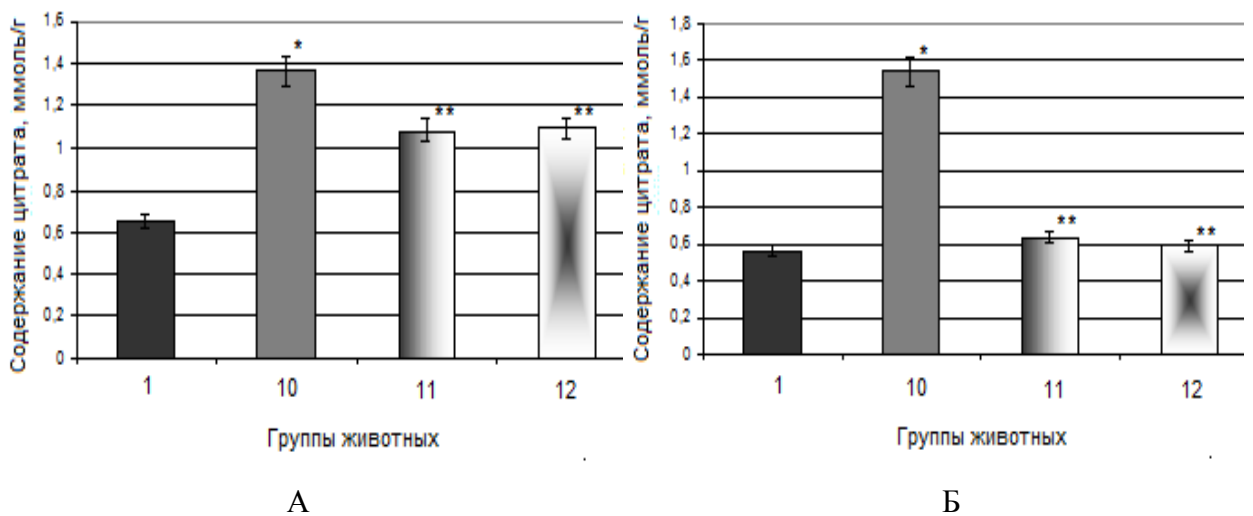


Г

Рис. 18. Концентрация цитрата в печени (А), в почках (Б), в сыворотке крови (В), в сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамина-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии

На фоне реализации стрептозоциновой модели индукции гипергликемии у крыс введение НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг приводило к снижению содержания цитрата в печени в 1,3 и 1,2 раза, в почках – в 2,4 и 2,6 раза, в сыворотке крови – в 1,5 и 1,4 раза и в сердце – в 1,8 и 1,2 раза соответственно (рис. 19).



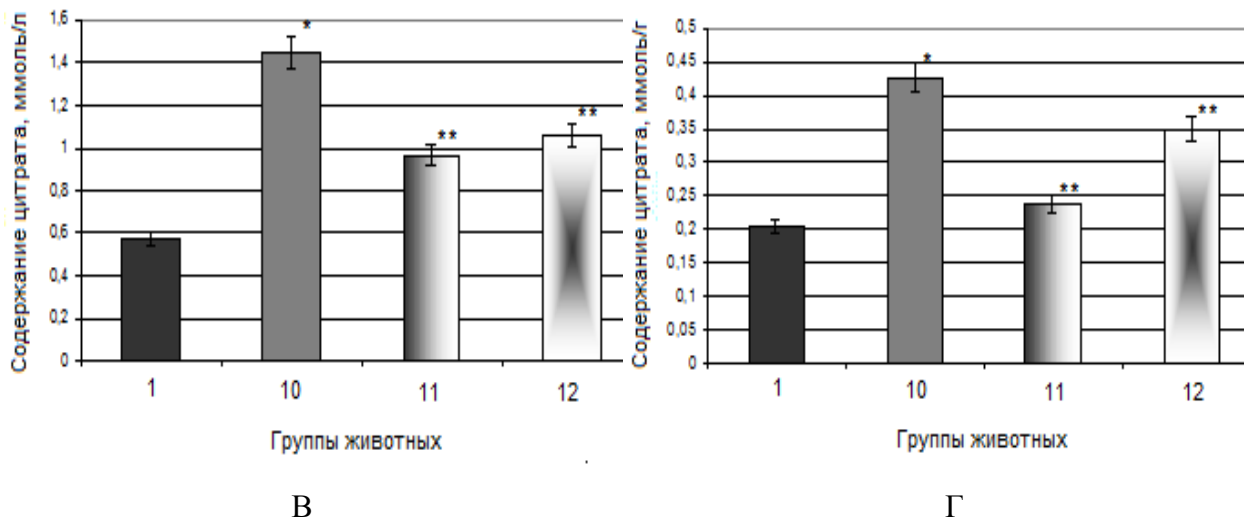


Рис. 19. Концентрация цитрата в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)
*Различия достоверны при $p < 0,05$ * - относительно контроля, ** - относительно патологии*

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии способности у бигуанидиновых производных оказывать позитивное регулирующее воздействие на свободнорадикальный гомеостаз, снижая степень проявления ОС при гипергликемии. Это подтверждается, в частности, значительным снижением показателей БХЛ, отражающих скорость свободнорадикальных процессов, уровня ОМБ, первичных продуктов ПОЛ и степени фрагментации ДНК в исследуемых тканях крыс с гипергликемией при введении исследуемых соединений.

ГЛАВА 4. ВОЗДЕЙСТВИЕ БИГУАНИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ КРЫС ПРИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

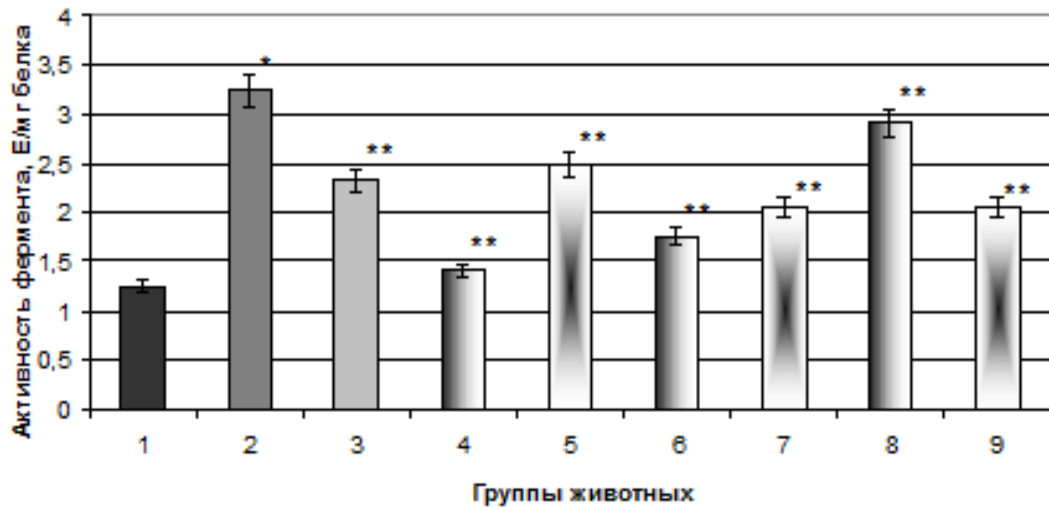
4.1. Активность супероксиддисмутазы и каталазы в тканях и сыворотке крови крыс при введении бигуанидиновых производных на фоне развития патологии

В результате проведенных исследований было установлено, что при развитии экспериментальной гипергликемии, которая сопровождалась значительным повышением интенсивности СО и нарастанием степени ОС, наблюдается интенсификация работы ферментного звена АОС (рис. 20-21, 25-26). Так, активность ключевых ферментов первой линии защиты организма от СР – СОД и каталазы, увеличилась в тканях крыс при гипергликемии, индуцированной стрептозоцином, относительно контрольных значений в печени в 2,4 и 2,3 раза, в почках и сыворотке крови – в 2,2 и 2,3 раза, в сердце – в 2,5 раза (рис. 21, 26). При гипергликемии, индуцированной протамин-сульфатом наблюдалась сходная тенденция увеличения удельной активности данных ферментов (рис. 20, 25). Также имел место рост активности СОД и каталазы, выраженной в виде Е/г сырой массы печени, почек, сердца и активности, выраженной в Е/мл сыворотки крови, у крыс при гипергликемии, вызванной как введением протамин-сульфата, так и стрептозоцина (рис. 3-4 приложения). Вероятно, изменение активности исследуемых ферментов носило адаптивно-компенсаторный характер в ответ на чрезмерное образование АФК. Известно, что при диабете наблюдается интенсификация генерации $O_2^{\cdot-}$ митохондриями, ксантиноксидазой, цитохромом Р450, а также НАДН/НАДФН-оксидазой, что может явиться причиной повышения активности СОД и, как следствие, каталазы [24].

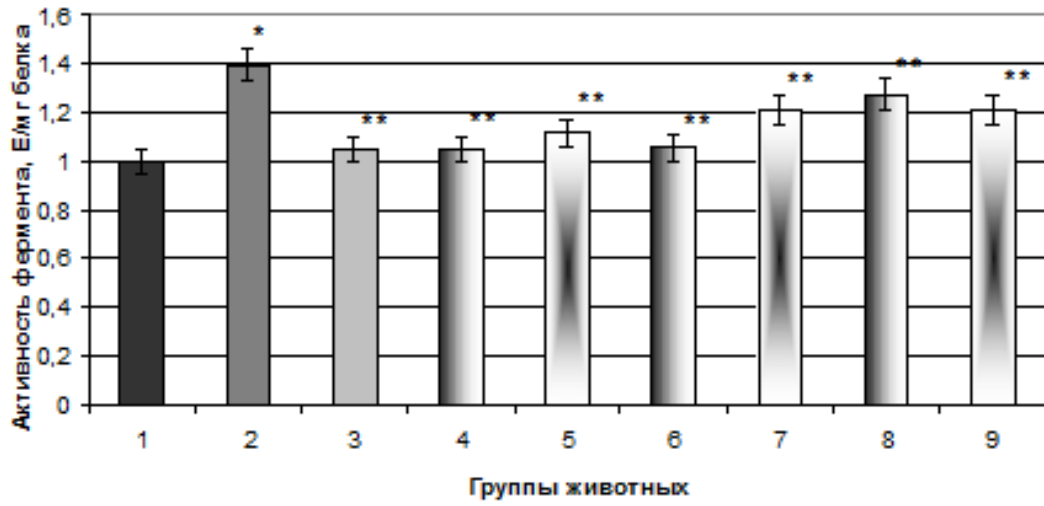
Введение метформина, НИПМГ и ДКБ экспериментальным животным с гипергликемией способствовало изменению активности СОД и каталазы в сторону снижения и приближения ее к контролю. Так, удельная активность СОД при действии НИПМГ и ДКБ в дозе 10 мг/кг на фоне гипергликемии, вызванной введением протамин-сульфата, снижалась соответственно в 2,3 и 1,3 раза в печени, в 1,3 раза в почках и в том, и в другом случае, в 1,6 и 1,5 раза в сыворотке крови и в 2,6 и 2,5 раза в сердце (рис. 20). Активность СОД, выраженная в Е/г сырой массы исследуемых тканей, изменялась при этом в 1,9 и 1,3 раза в печени, в 1,2 раза в почках и при введении НИПМГ и при введении ДКБ, в 2,7 и 2,2 раза в сердце в сторону приближения к контрольным значениям (рис. 3 приложения). Активность фермента, выраженная в Е/мл сыворотки крови, уменьшалась при введении НИПМГ и ДКБ в дозе 10 мг/кг в 1,4 и 1,2 раза (рис. 3 приложения). При действии протекторов в дозе 25 мг/кг удельная активность СОД снижалась в 1,2 и 1,6 раза в печени, в 1,2 раза в почках, в 1,6 и 1,3 раза в сыворотке крови

и в 2,5 и 2,7 раза в сердце (рис. 20). Влияние НИПМГ и ДКБ в той же дозе на активность СОД, выраженную в виде Е/г сырой массы и в Е/мл сыворотки крови, носило схожий характер (рис. 3 приложения).

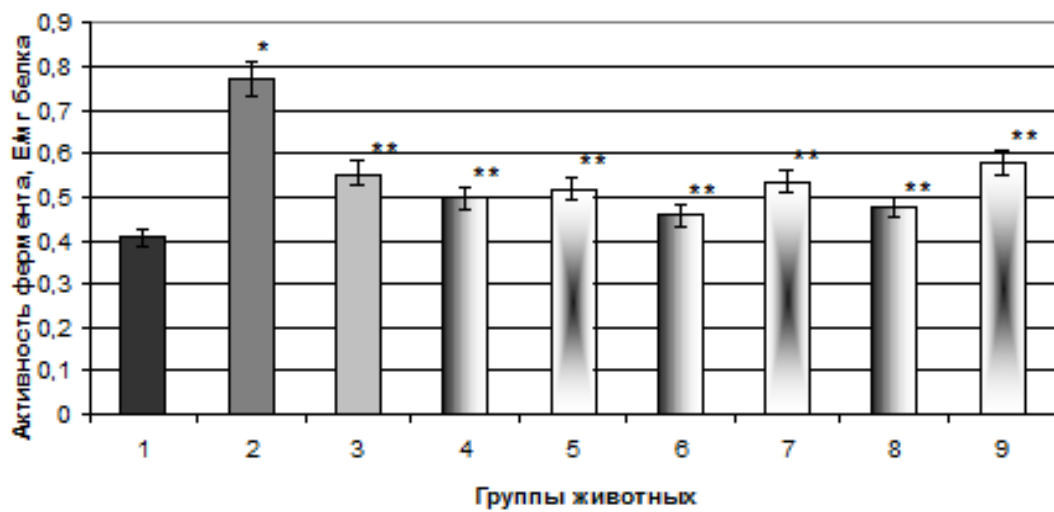
При введении НИПМГ в дозе 15 мг/кг животным с гипергликемией, вызванной как введением протамин-сульфата, так и стрептозоцина, удельная активность СОД снижалась, изменяясь в сторону нормы, в печени - в 1,8 и 1,5 раза, в почках - в 1,3 и 1,8 раза, в сердце в 2,4 и 2,2 раза и в сыворотке крови в 1,7 и 1,9 раза соответственно (рис. 20-21). При введении НИПМГ в дозе 15 мг/кг животным с гипергликемией, вызванной как введением протамин-сульфата, так и стрептозоцина, активность СОД, выраженная в виде Е/г сырой массы, уменьшалась в печени - в 1,5 и 1,6 раза, в почках - в 1,6 и 1,8 раза, в сердце в 2,1 и 1,5 раза и, в виде Е/мл сыворотке крови - в 1,4 и 1,7 раза (рис. 3-4 приложения). При введении ДКБ в той же дозе животным с патологией наблюдались следующие результаты: в печени удельная активность СОД снижалась в 1,6 и 1,3 раза, в почках – в 1,2 и 1,3 раза, в сердце – в 1,7 раза и в том, и в другом случае, и в сыворотке крови – в 1,4 и 1,7 раза соответственно (рис. 20-21). Активность СОД, выраженная в виде Е/г сырой массы, при этом, снижалась в печени в 1,3 и 1,5 раза, в почках – в 1,3 и 1,4 раза, в сердце – в 1,9 и 1,2 раза. В сыворотке крови активность фермента, выраженная в Е/мл, уменьшалась при введении ДКБ в дозе 15 мг/кг в 1,2 раза на фоне гипергликемии, вызванной введением протамин-сульфата, и в 1,5 раза при гипергликемии, индуцированной стрептозоцином (рис. 3-4 приложения).



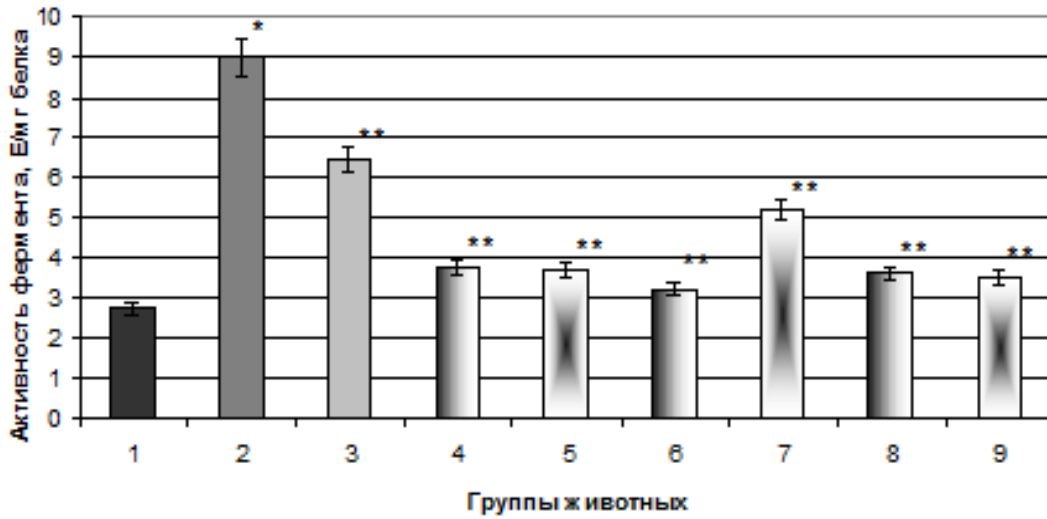
А



Б



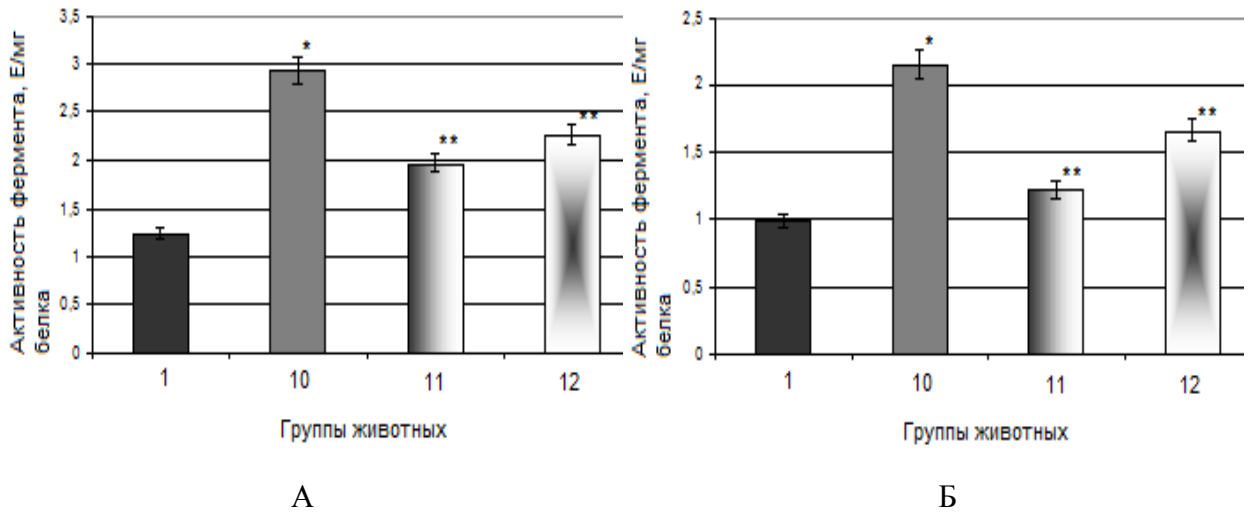
В



Г

Рис. 20. Удельная активность супероксиддисмутазы в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



А

Б

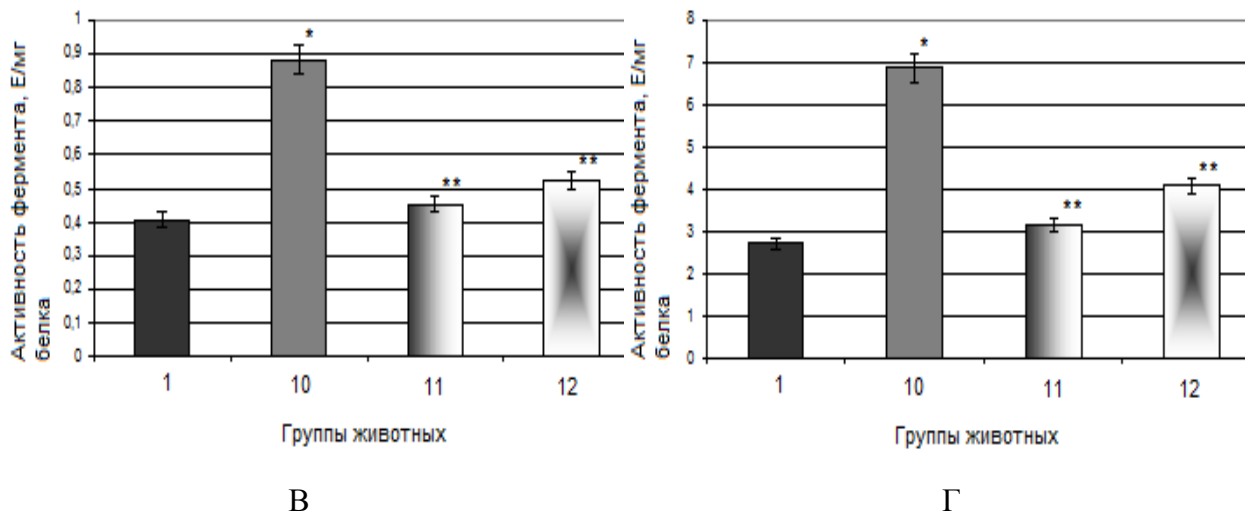


Рис. 21. Удельная активность супероксиддисмутазы в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

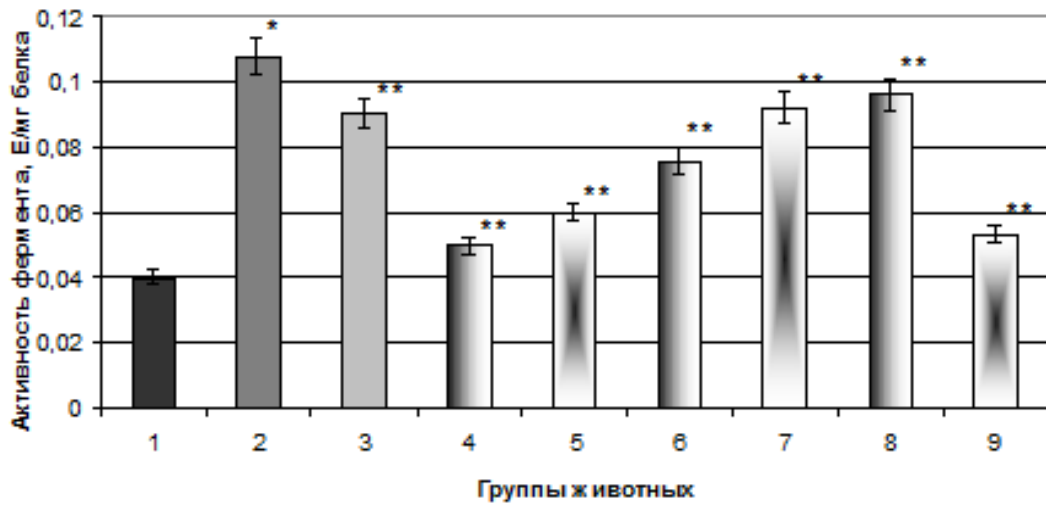
Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии

Из литературных источников известно, что метформин способен ингибировать НАДН-дегидрогеназный комплекс ЭТЦ митохондрий и связанную с ним генерацию АФК [179]. Кроме того, метформин способен ингибировать НАДФН-оксидазу, работа которой сопряжена с образованием супероксидного анион-радикала [166]. В этой связи можно предполагать, что НИПМГ и ДКБ также могут оказывать антиоксидантный эффект, в основе которого лежат подобные механизмы действия. Изменение активности СОД в сторону контрольных значений при введении исследуемых бигуанидов, видимо, обусловлено снижением уровня супероксидного анион-радикала в результате реализации антиоксидантного действия данных веществ, причем более выраженного, чем у препарата сравнения.

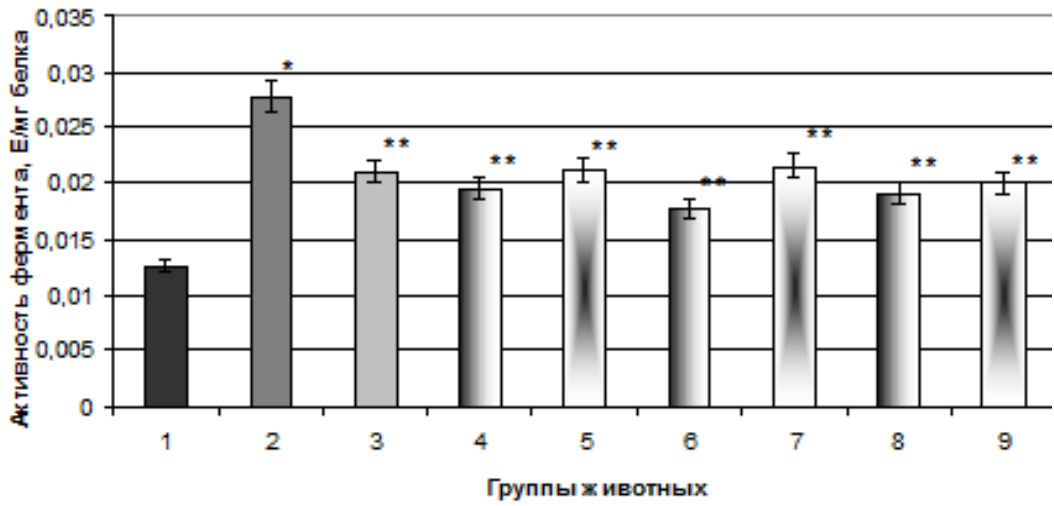
Также при введении бигуанидиновых производных выявлено снижение активности каталазы относительно значений при гипергликемии (рис. 22-23). Удельная активность данного фермента при действии НИПМГ в дозе 10 мг/кг на фоне гипергликемии, индуцированной протамин-сульфатом, снижалась в печени, почках, сыворотке крови и сердце крыс в 2,2, 1,4, 2,1 и 1,9 раза; в дозе 15 мг/кг – в 1,4, 1,6, 1,7, 2,4 раза и в дозе 25 мг/кг – в печени – в 1,2 раза, в почках и сердце – в 1,5 раза, в сыворотке крови – в 1,4 раза соответственно (рис. 22). При введении ДКБ в дозе 10 мг/кг удельная активность каталазы снижалась в печени в 1,8 раза, в почках – в 1,3 раза, в сыворотке крови – в 1,9 раза и в сердце – в 1,7 раза; в дозе 15 мг/кг – в печени и сыворотке крови – в 1,2 раза, в почках и

сердце – в 1,3 раза; в дозе 25 мг/кг – в печени – в 2,0 раза, в почках – в 1,4 раза, в сыворотке крови – в 2,1 раза и в сердце – в 1,9 раза соответственно, изменяясь в направлении контрольных значений (рис. 22). В ходе определения активности каталазы, выраженной в Е/г сырой массы печени, почек и сердца, и в Е/мл сыворотки крови, при введении бигуанидиновых производных крысам с гипергликемией, индуцированной с помощью введения протамин-сульфата, была выявлена картина, сходная с изменениями удельной активности (рис. 5 приложения). При введении метформина в дозе 15 мг/кг крысам с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом, наблюдалось снижение как удельной активности каталазы, так и активности фермента, выраженной в Е/г сырой массы тканей и Е/мл сыворотки крови: в печени – в 1,2 раза и в первом виде активности и во втором, в почках – в 1,3 и 1,4 раза, в сыворотке крови – в 1,6 раза (удельная активность и активность, выраженная в Е/мл), в сердце – в 1,4 и 1,6 раза соответственно (рис. 22), (рис. 6 приложения).

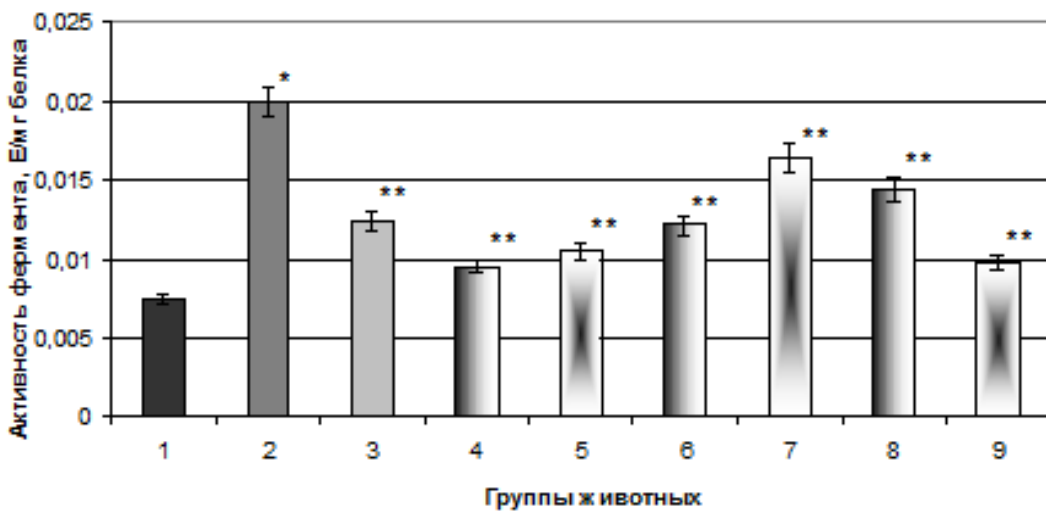
При введении бигуанидиновых производных животным с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином, в дозе 15 мг/кг наблюдалось изменение как удельной активности каталазы, так и активности, выраженной в Е/г сырой массы исследуемых тканей и в Е/мл сыворотки крови, в сторону нормы (рис. 23), (рис. 6 приложения). Так, при действии НИПМГ удельная активность каталазы в печени снижалась в 1,5 раза, в почках - в 1,7 раза, в сердце и сыворотке крови - в 2,1 раза (рис. 23). При введении ДКБ животным с патологией, индуцированной введением стрептозоцина, были получены следующие результаты: в печени удельная активность каталазы снижалась в 1,2 раза, в почках, сердце и сыворотке крови – в 1,5 раза относительно данных у крыс с гипергликемией (рис. 23).



А



Б



В

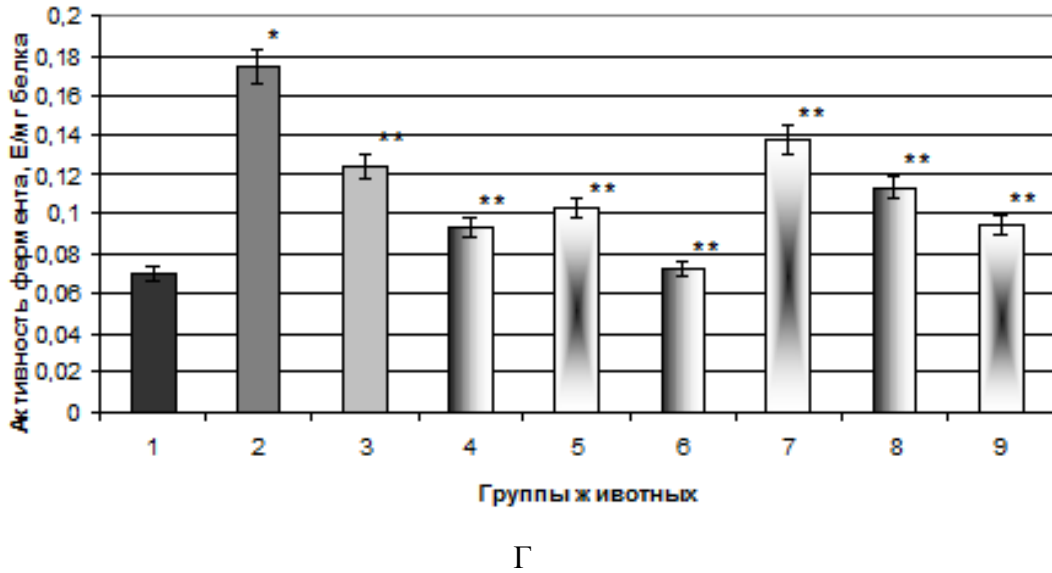
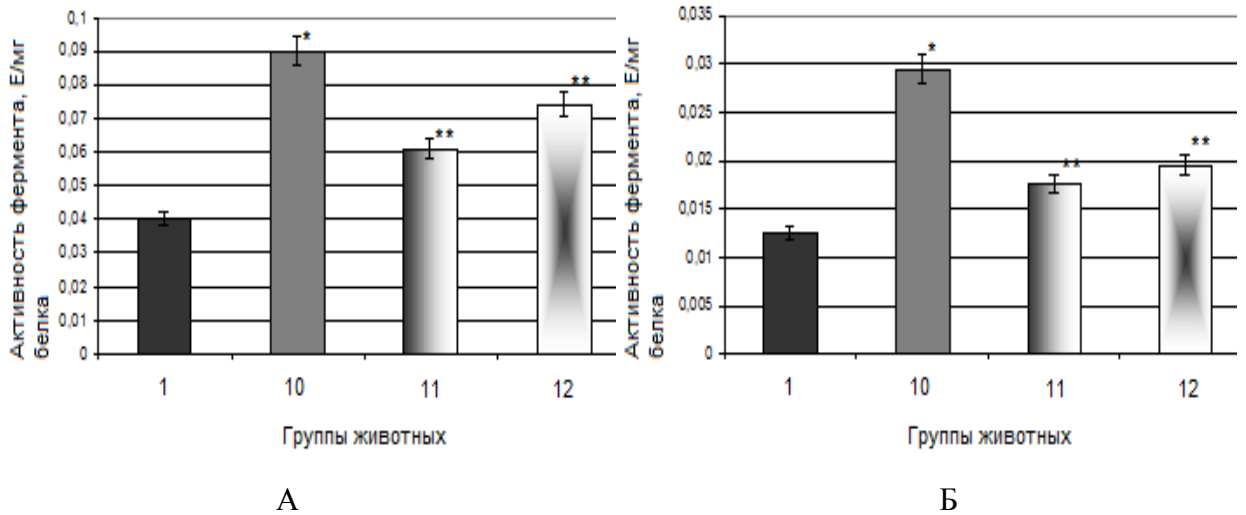


Рис. 22. Удельная активность каталазы в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



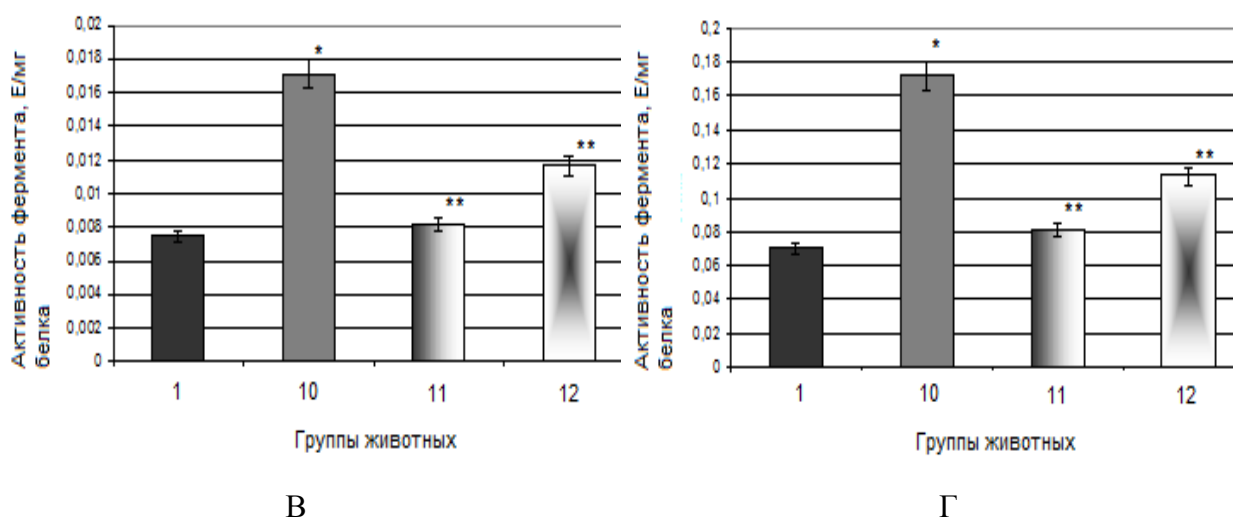


Рис. 23. Удельная активность каталазы в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

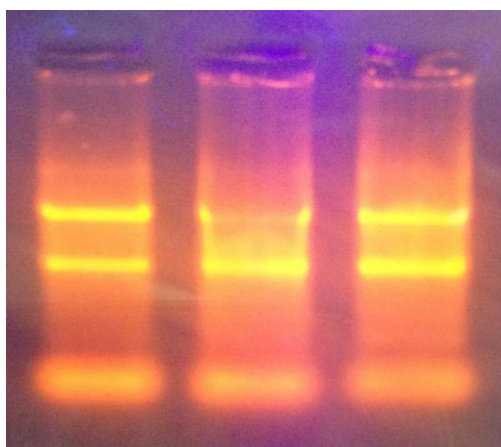
Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии

Исходя из результатов, полученных в ходе исследования функционирования ферментов первой линии защиты от СР при введении НИПМГ и ДКБ животным с гипергликемией, можно сделать вывод о проявлении ими антиоксидантных свойств, что способствует снижению степени образования АФК, и, как следствие, нормализации работы АОС. По-видимому, данные соединения можно рассматривать как антиоксиданты прямого действия [26] из-за наличия в их структуре бигуанидинового фрагмента и пиперидинового гетероцикла, проявляющего электронно-донорные свойства, что обеспечивает возможность смещения электронной плотности в сторону бигуанидинового фрагмента, ответственного за взаимодействие со свободными радикалами.

4.2. Уровень транскриптов генов супероксиддисмутазы и каталазы в тканях крыс при введении бигуанидиновых производных на фоне развития патологии

Из литературных источников известно об уменьшении скорости синтеза СОД в клетке *de novo* при снижении интенсивности ОС [80, 157], что подтверждается в ходе определения уровня транскриптов гена данного фермента. С целью оценки интенсивности экспрессии СОД на первом этапе было проведено выделение РНК с последующей визуализацией с целью выявления отсутствия деградации образцов. При анализе полученной электрофореграммы наблюдалось наличие двух ярких полос,

соответствующих 28S- и 18S-рибосомальной РНК (рис. 24). Качество РНК оставалось постоянным во всех группах в пределах одного органа и незначительно различалось для различных органов.



печень почки сердце

Рис. 24. Электрофореграмма тотальной РНК из тканей животных

На следующей стадии в ходе обратной транскрипции была получена библиотека кДНК экспрессирующегося гена *Sod1*, которая использовалась в дальнейшем для проведения ПЦР-РВ. Все реакции амплификации подчинялись стандартной кинетике, при которой на кривой накопления ампликонов четко визуализируются три фазы: начальная, логарифмическая и фаза насыщения (рис. 25).

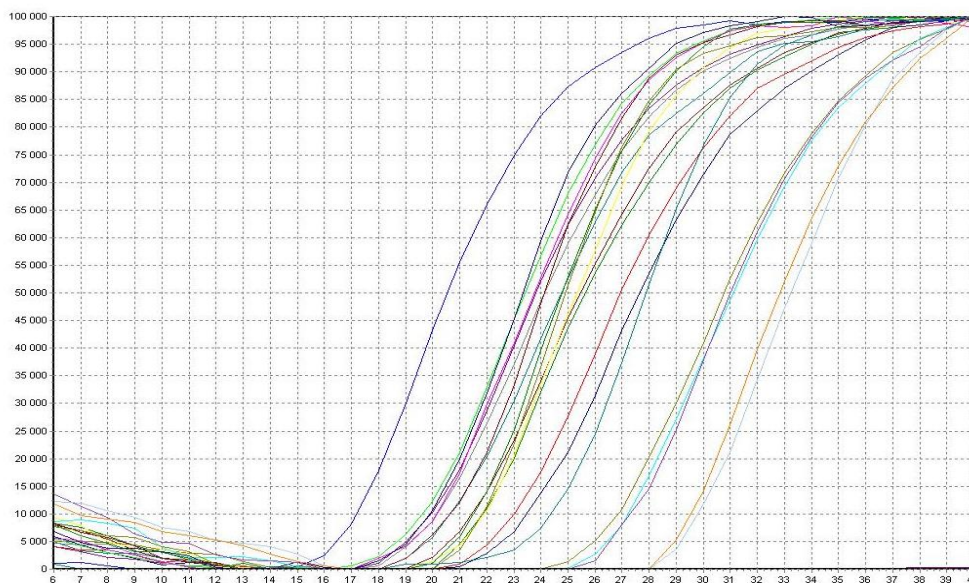
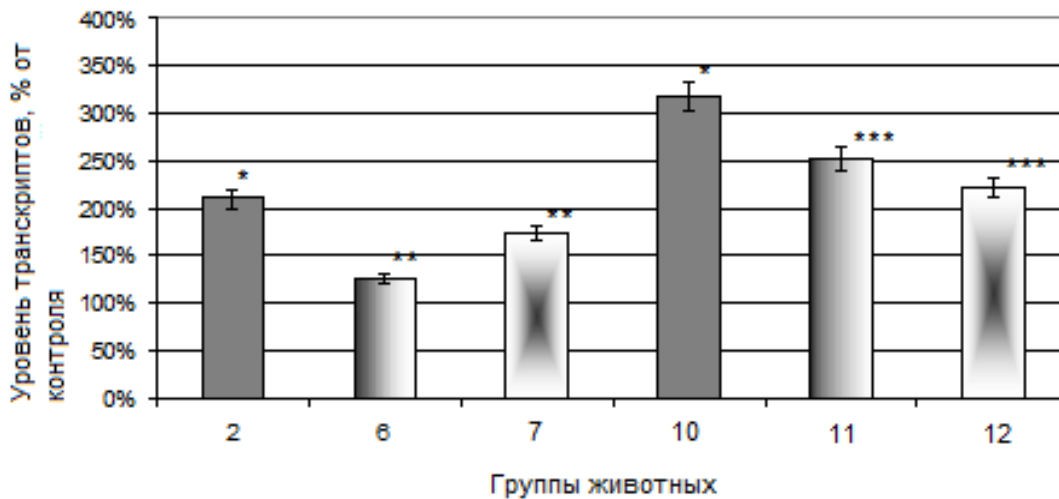
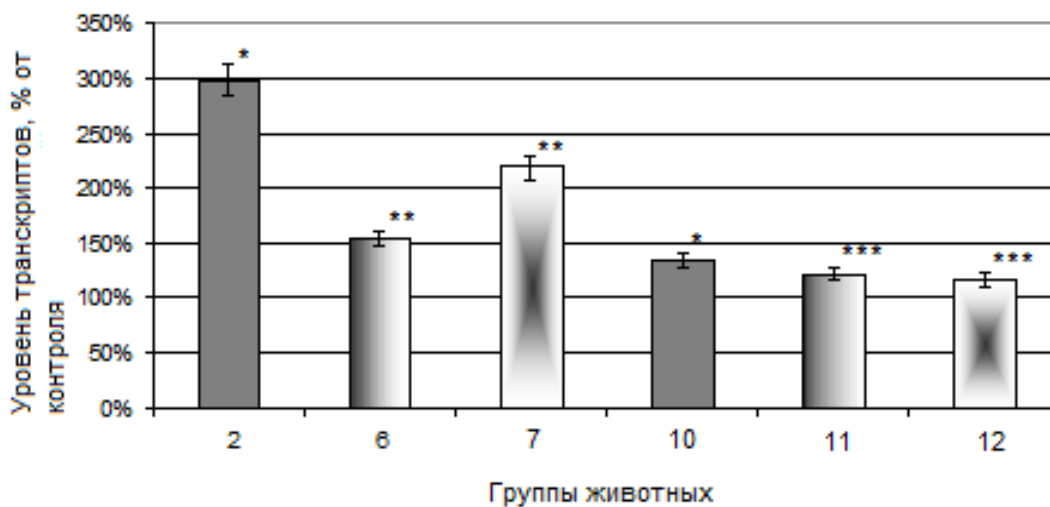


Рис. 25. Кинетическая кривая изменения флуоресцентного сигнала при накоплении продуктов амплификации в ходе проведения ПЦР в режиме реального времени

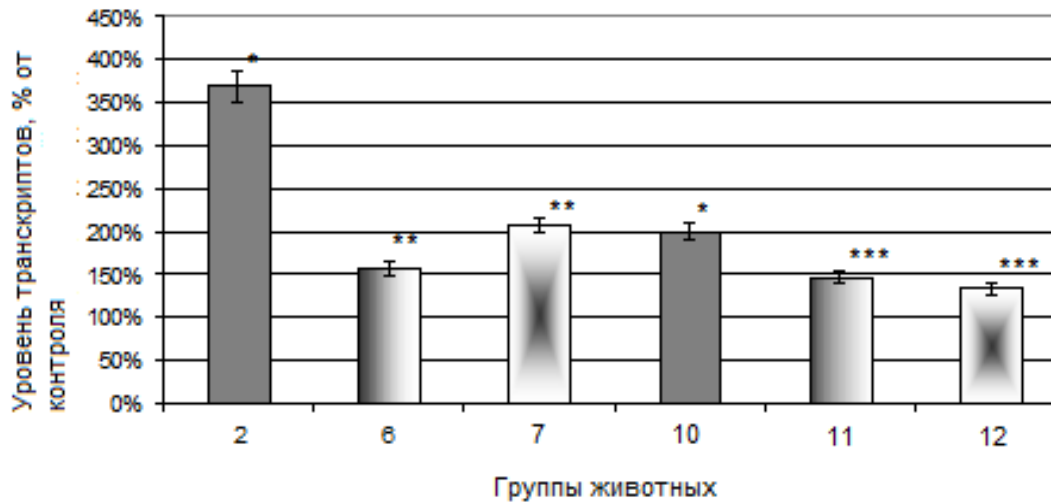
В ходе эксперимента было установлено, что при развитии гипергликемии, вызванной введением как протамин-сульфата, так и развивающейся при стрептозоциновой модели индукции, уровень транскриптов СОД возрастал в печени в 2,1 и 3,2 раза, в почках в 3,0 и 1,3 раза, в сердце в 3,7 и 2,0 раза соответственно (рис. 26). Введение НИПМГ и ДКБ животным с патологией, индуцированной воспроизведением и первой, и второй модели, приводило к снижению степени экспрессии гена СОД. Так, при действии НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг у животных, которым вводили протамин-сульфат, относительный уровень транскрипции гена *Sod1* снижался в печени в 1,7 и 1,2 раза, в почках – в 1,9 и 1,4 раза, в сердце – в 2,4 и 1,8 раза (рис. 26). У крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином, относительный уровень транскриптов гена *Sod1* при введении бигуанидиновых производных снижался в печени в 1,4 и 1,3 раза; в почках – в 1,2 раза при введении как НИПМГ, так и ДКБ; и в сердце – в 1,5 и 1,4 раза соответственно (рис. 26).



А



Б

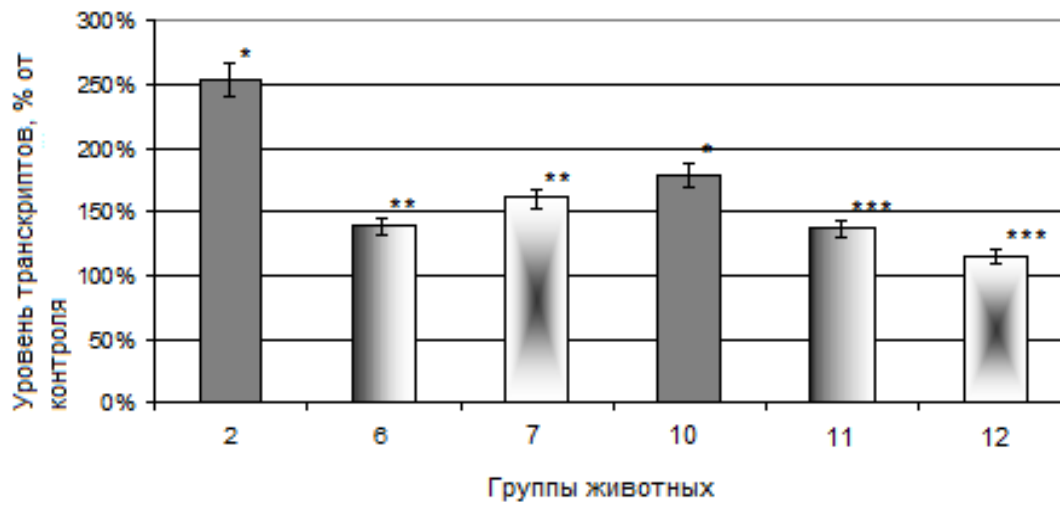


В

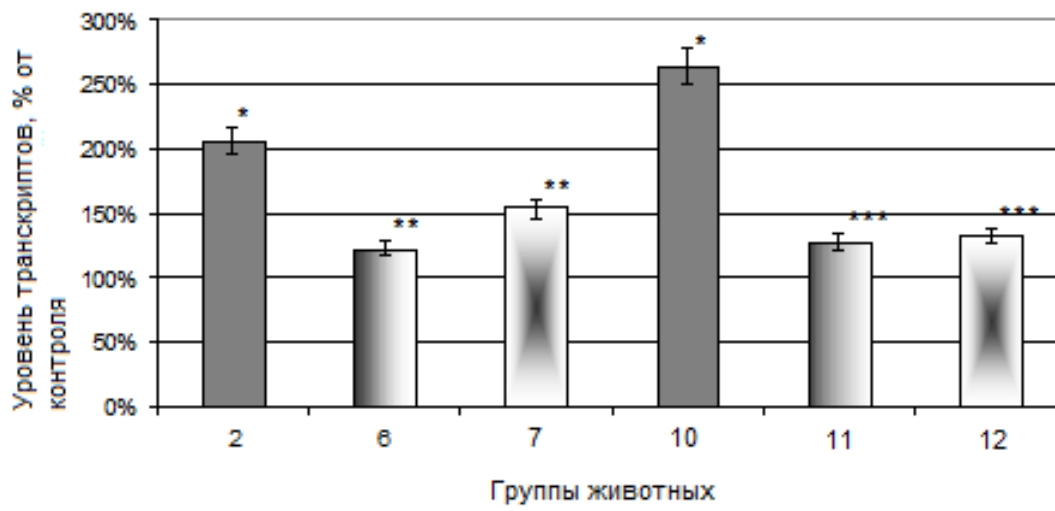
Рис. 26. Уровень транскриптов гена *Sod1* в печени (А), почках (Б) и сердце (В) крыс с гипергликемией, индуцированной протамина-сульфатом (2), стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6, 11) и ДКБ (7, 12). Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, взятого за 100%, ** - относительно показателей при гипергликемии, индуцированной протамина-сульфатом, *** - относительно показателей при гипергликемии, индуцированной стрептозоцином

В ходе эксперимента было установлено, что при развитии гипергликемии, индуцированной введением протамина-сульфата, а также развивающейся на фоне действия стрептозоцина, уровень транскриптов гена каталазы возрастал в печени в 2,5 и 1,8 раза, в почках в 2,1 и 2,6 раза, в сердце в 2,4 и 3,6 раза соответственно (рис. 27). Введение НИПМГ и ДКБ с гипергликемией, вызванной путем воспроизведения как одной, так и другой модели, приводило к снижению степени экспрессии гена каталазы. Так, при действии НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг у животных, которым вводили протамина-сульфат, относительный уровень транскрипции гена *Cat* снижался в печени в 1,8 и 1,6 раза, в почках – в 1,7 и 1,3 раза, в сердце – в 1,3 и 1,2 раза относительно данных при патологии (рис. 27).

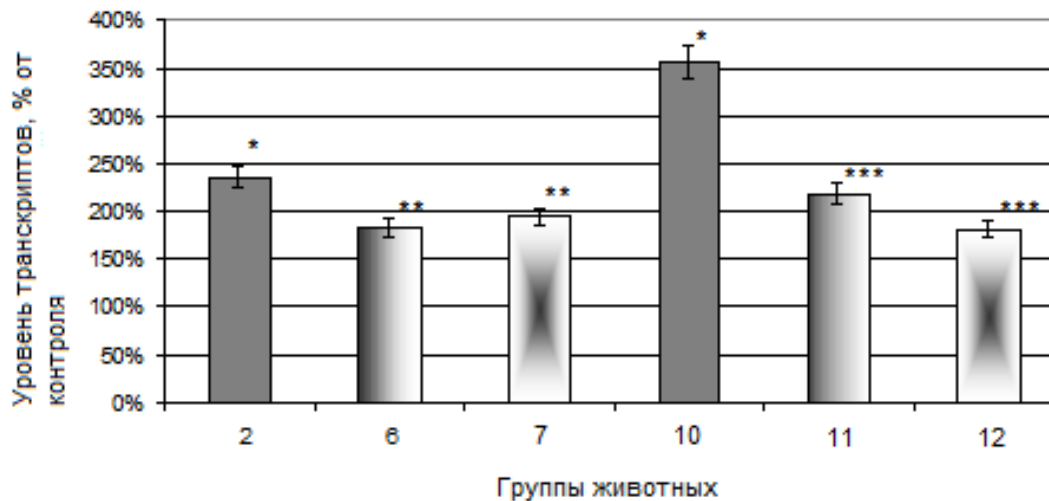
При индукции гипергликемии с помощью стрептозоцина и введении на фоне патологии НИПМГ и ДКБ экспрессия гена *Cat* уменьшалась в 1,6 и 1,3 раза в печени, в 2,1 и 2,0 раза в почках, и в 2,0 и 1,6 раза в сердце относительно в патологическом состоянии (рис. 27).



А



Б



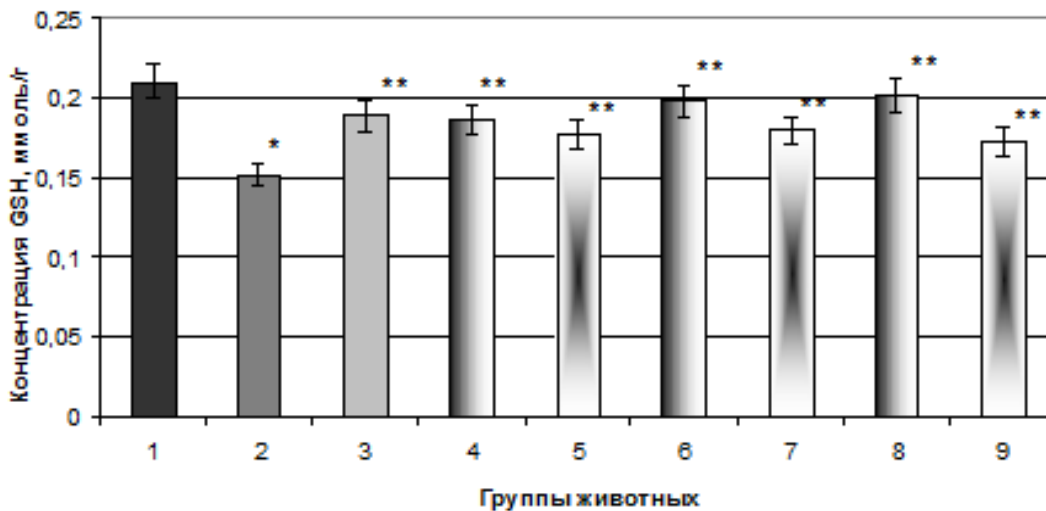
В

Рис. 27. Уровень транскриптов гена *Cat* в печени (А), почках (Б) и сердце (В) крыс с гипергликемией, индуцированной протамина-сульфатом (2), стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6, 11) и ДКБ (7, 12) *Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, взятого за 100%, ** - относительно показателей при гипергликемии, индуцированной протамина-сульфатом, *** - относительно показателей при гипергликемии, индуцированной стрептозоцином*

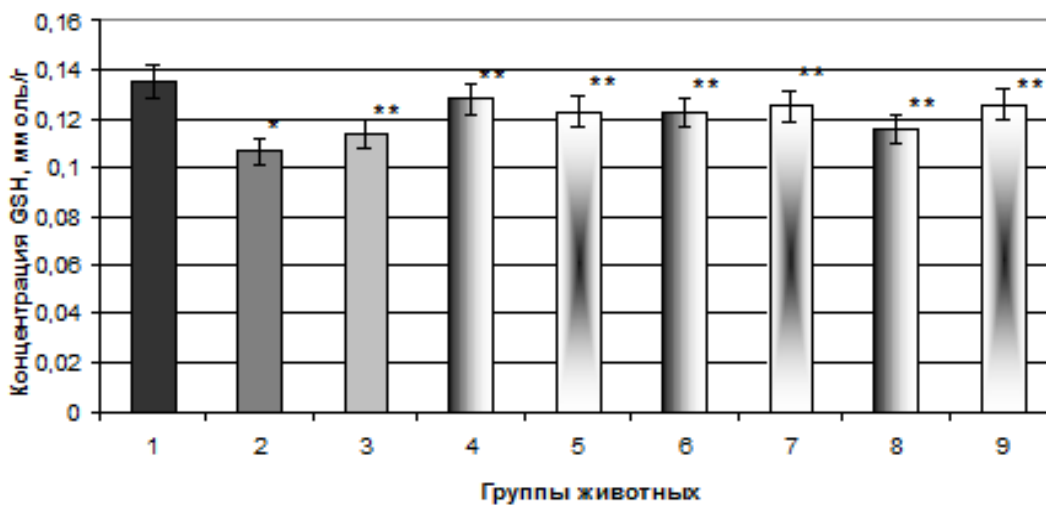
4.3. Влияние бигуанидиновых производных на активность ферментов глутатионового звена антиоксидантной системы в тканях и сыворотке крови крыс при гипергликемии

Результаты проведенных исследований показали, что при гипергликемии наблюдается снижение содержания GSH в тканях и сыворотке крови крыс (рис. 28-29). При индукции патологического состояния стрептозоцином количество GSH уменьшилось в печени в 1,6 раза, в почках – в 1,9 раза, в сыворотке крови – в 2,1 раза и в сердце – в 1,8 раза относительно контрольных значений (рис. 29). Это согласуется с данными, полученными при реализации протамина-сульфатной модели развития гипергликемии (рис. 28). Можно предположить, что восстановленная форма этого тиола расходовалась на обезвреживание СР, а также на поддержание окислительно-восстановительного гомеостаза клетки, дисбалансированного при патологии. Кроме того, причиной падения концентрации восстановленного глутатиона может быть снижение интенсивности функционирования пентозофосфатного пути при СД, вследствие чего уменьшается доступность НАДФН, необходимого для регенерации GSH [98]. Снижение концентрации глутатиона, согласно литературным данным, также было выявлено в плазме и эритроцитах больных с СД1 и длительно протекающим СД2 [129].

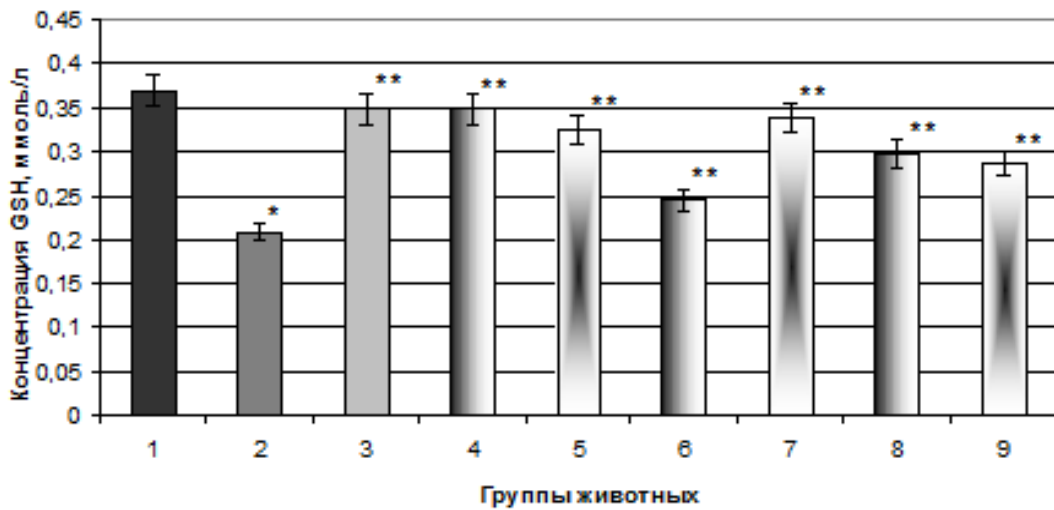
При действии НИПМГ и ДКБ в дозе 10 мг/кг выявлено повышение концентрации GSH в печени и почках в 1,2 раза, в сыворотке крови – в 1,7 и 1,6 раза, в сердце – в 1,3 раза соответственно относительно его содержания у животных с гипергликемией, вызванной введением протамин-сульфата (рис. 28). У животных с гипергликемией, индуцированной тем же способом, при введении препарата сравнения и исследуемых протекторов в дозе 15 мг/кг, содержание GSH увеличивалось в 1,2 (метформин, ДКБ) и 1,3 раза (НИПМГ) в печени, в 1,1 (метформин) и 1,2 раза (НИПМГ, ДКБ) в почках, в 1,7, 1,2 и 1,6 раза в сыворотке крови и в 1,3, 1,4 и 1,2 раза в сердце (рис. 28). Введение НИПМГ и ДКБ в дозе 25 мг/кг приводило к возрастанию содержания восстановленного глутатиона в 1,3 (НИПМГ) и 1,2 раза (ДКБ) в печени и сердце соответственно; в 1,2 раза в почках и при введении НИПМГ, и при введении ДКБ; в 1,4 раза в сыворотке крови и при действии первого, и при действии второго бигуанида, приближая значения данного показателя к норме (рис. 28).



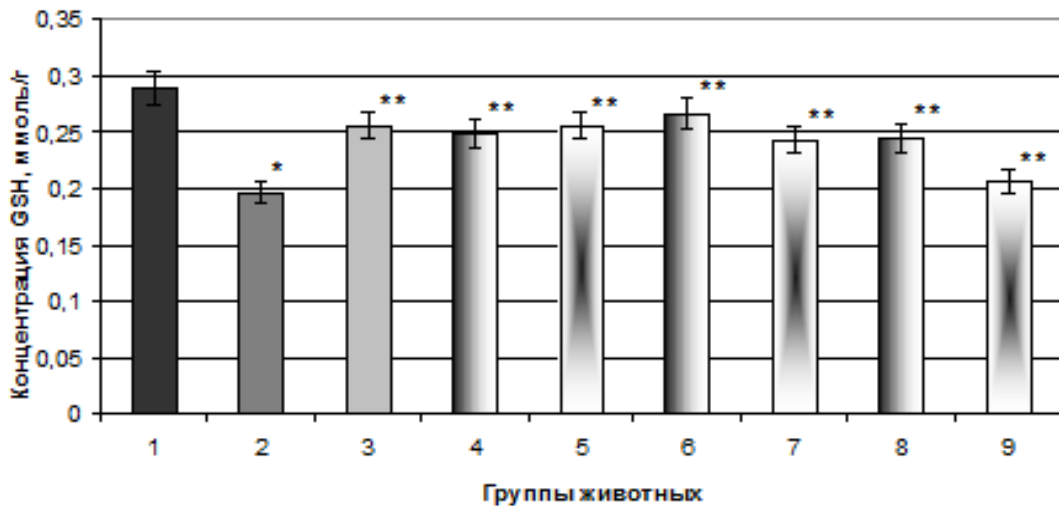
А



Б



В



Г

Рис. 28. Содержание восстановленного глутатиона в печени (А), в почках (Б), в сыворотке крови (В), в сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии

При введении НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг животным с гипергликемией, вызванной введением стрептозоцина, наблюдалось повышение концентрации восстановленного глутатиона в печени в 1,4 раза, в почках – в 1,8 и 1,7 раза, в сыворотке крови – в 1,7 и 1,3 раза и в сердце – в 1,6 и 1,2 раза относительно данных, выявленных у крыс с патологией (рис. 29).

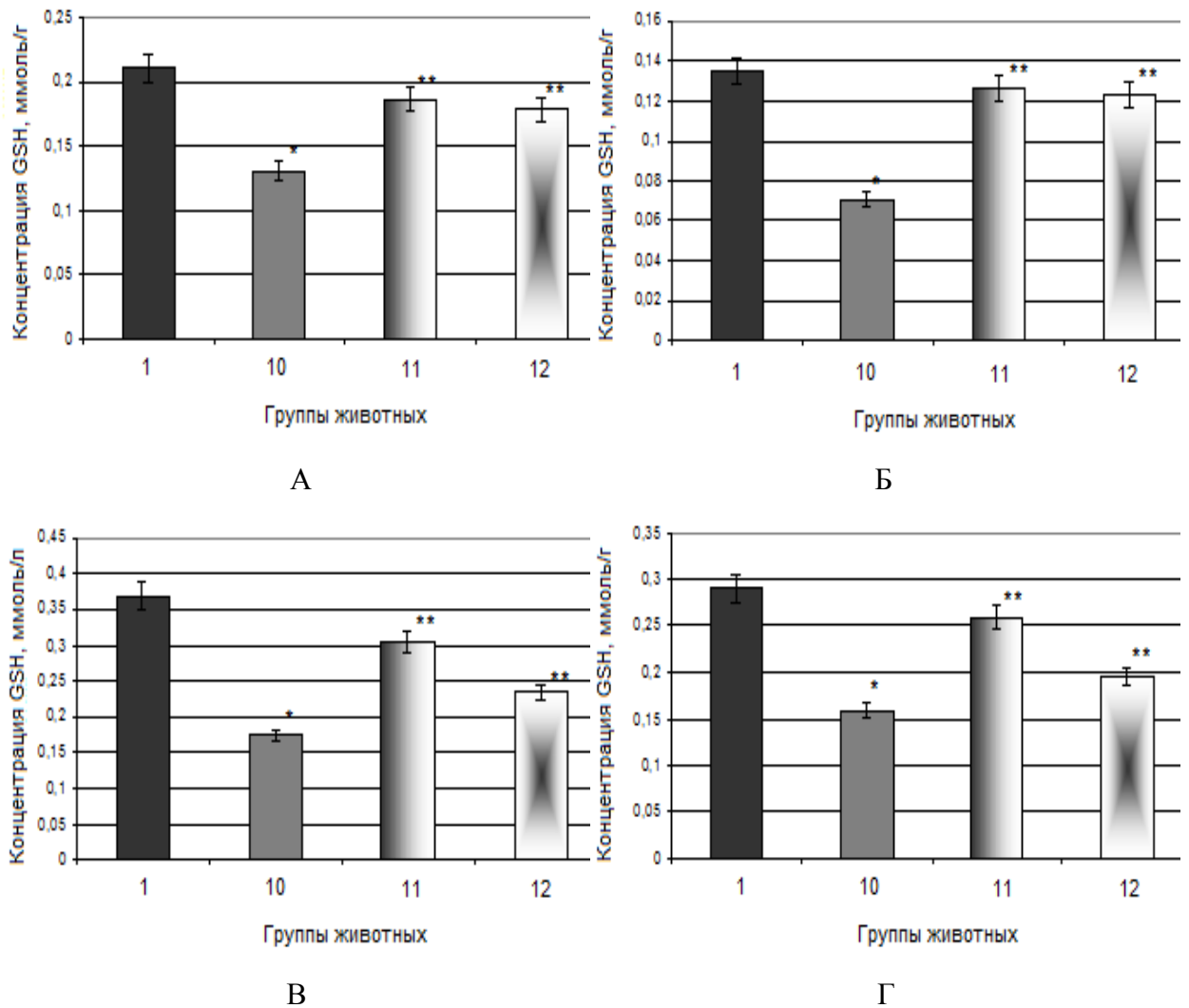


Рис. 29. Содержание восстановленного глутатиона в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии

Наряду с этим, у животных с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином, выявлено увеличение активности ГП, ГР и ГТ, выраженной как в виде удельной активности, так и рассчитанной в Е/г сырой массы ткани и Е/мл сыворотки крови (рис. 30-35) (рис. 7-12 приложения). При развитии гипергликемии, вызванной введением стрептозоцина, в печени крыс удельная активность этих ферментов увеличилась в 2,6, 1,9 и 2,3 раза, в почках – 2,6, 2,0 и 2,3 раза, в сыворотке крови – в 2,7, 2,8 и 2,4 раза, в сердце – в 2,6, 2,3 и 2,2 раза соответственно относительно контрольных значений (рис. 31, 33, 35). Активность глутатион-зависимых ферментов, выраженная в Е/г сырой массы печени, на

фоне развития стрептозоциновой модели гипергликемии у крыс также возрастала при этом: в 2,5, 1,6 и 1,9 раза в печени; в 2,2, 1,6 и 1,9 раза в почках; в 2,4, 2,1 и 2,0 раза в сердце для ГП, ГР и ГТ соответственно (рис. 8, 10, 12 приложения). Активность ГП, ГР и ГТ, выраженная в Е/мл сыворотки крови, у крыс с гипергликемией, вызванной введением стрептозоцина, увеличилась в 2,5, 2,6 и 2,3 раза относительно нормальных значений (рис. 8, 10, 12 приложения).

У животных с гипергликемией, развивающейся на фоне реализации протамин-сульфатной модели, активность ферментов глутатионового звена изменялась сходным образом относительно значений нормы (рис. 30, 32, 34), (рис. 7, 9, 11 приложения). Очевидно, что при нарастании ОС, спровоцированного гипергликемическим патогенезом, происходит интенсификация функционирования ферментов глутатионового обмена. Имеются литературные источники, свидетельствующие о мобилизации ГП-ГР-системы в условиях нарастания окислительного стресса [146, 173]. Ген ГП, как и гены СОД и каталазы, имеет в области промотора сайт связывания для фактора транскрипции NF-κB [146], который контролирует экспрессию многих генов антиоксидантных ферментов в ответ на стресс. При этом также известно, что транскрипция гена ГР зависит от степени восстановленности фактора ОхуR [146], активация которого под действием пероксида водорода стимулирует синтез примерно 30 ферментов, в том числе и ГР.

При тестировании метформина в дозе 15 мг/кг на фоне гипергликемии, индуцированной протамин-сульфатом, были получены следующие результаты изменения активности ГП, ГР и ГТ: в печени удельная активность данных ферментов снижалась в 2,0, 1,7 и 1,1 раза, в сыворотке крови – в 2,0, 1,6 и 1,8 раза, в почках – в 1,6 (ГП) и 1,3 раза (ГР, ГТ), в сердце – в 1,2 (ГП) и 1,4 раза (ГР, ГТ) (рис. 30, 32, 34). Активность глутатион-зависимых ферментов, выраженная в Е/г сырой массы тканей и в Е/мл сыворотки крови, при реализации протекторного действия метформина изменялась сходным образом (рис. 7, 9, 11 приложения). Вместе с тем, при введении бигуанидиновых производных крысам с гипергликемией, индуцированной как протамин-сульфатом, так и стрептозоцином, во всех испытываемых дозах имело место снижение как удельной активности глутатион-зависимых ферментов, так и активности данных ферментов, выраженной в Е/г сырой массы и в Е/мл сыворотки крови (рис. 30-35), (рис. 7-12 приложения). Введение НИПМГ в дозе 10 мг/кг крысам на фоне гипергликемии, вызванной введением протамин-сульфата, способствовало изменению удельной активности ГП, ГР и ГТ в сторону снижения в печени в 1,9, 1,8 и 1,5 раза, в почках – в 1,5, 1,7 и 1,2 раза, в сыворотке крови – в 1,6, 1,9 и 1,8 раза и в сердце – в 1,4, 1,4 и 1,5 раза соответственно (рис. 30, 32, 34). При действии ДКБ в той же дозе изменения удельной активности ферментов глутатионового звена были

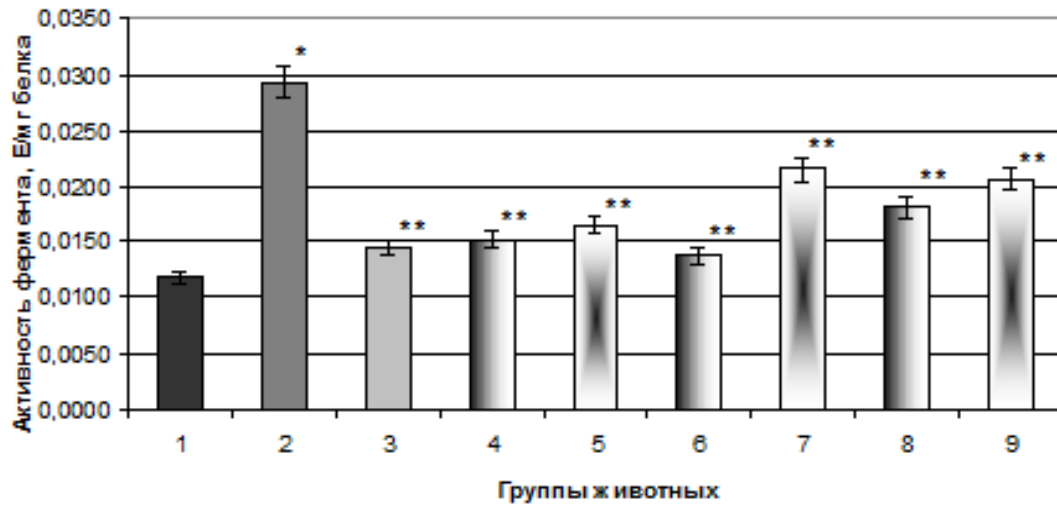
следующие: в печени наблюдалось уменьшение их активности на 78, 63 и 17 %; в почках - на 26, 35 и 28%; в сыворотке крови – на 43, 19 и 59 %, в сердце крыс активность ГП и ГР снижалась на 25%, а активность ГТ – на 43%, по сравнению с уровнем при патологии (рис. 30, 32, 34).

При использовании НИПМГ в качестве протектора в дозе 15 мг/кг, также наблюдалось снижение удельной активности ферментов глутатионового звена (ГП, ГР, ГТ) на фоне гипергликемии, вызванной введением протамин-сульфата: в печени в 2,1, 1,7 и 1,8 раза, в почках – в 1,8, 1,5 и 1,6 раза, в сыворотке крови – в 3,1, 1,9 и 1,8 раза и в сердце крыс – в 1,2, 1,4 и 1,5 раза соответственно относительно данных при патологии (рис. 30, 32, 34). Изменения активности данных ферментов, выраженной в Е/г сырой ткани и Е/мл сыворотки крови, при введении НИПМГ в дозе 15 мг/кг крысам с гипергликемией, вызванной введением протамин-сульфата, носили сходный характер (рис. 7, 9, 11 приложения). При действии ДКБ в дозе 15 мг/кг на фоне индукции гипергликемии введением протамин-сульфата, в печени крыс удельная активность ГП, ГР и ГТ снижалась на 37, 25 и 41% (рис. 30, 32, 34). Активность ферментов, выраженная в Е/г сырой массы при этом уменьшалась на 114, 38 и 18% (рис. 7, 9, 11 приложения). В почках удельная активность ГП, ГР, ГТ снижалась на 65, 19 и 22% (рис. 30, 32, 34), а активность, выраженная в Е/г сырой массы – на 37, 56 и 19% (рис. 7, 9, 11 приложения). В сыворотке крови удельная ферментативная активность при введении ДКБ в дозе 15 мг/кг уменьшалась на 83, 84 и 30% (рис. 30, 32, 34), активность, выраженная в Е/мл сыворотки крови – на 118, 40 и 24% (рис. 7, 9, 11 приложения). В сердце крыс удельная активность ферментов уменьшалась на 18, 23 и 28% (рис. 30, 32, 34), а активность, выраженная в Е/г сырой массы - на 19, 25 и 7% соответственно (рис. 7, 9, 11 приложения).

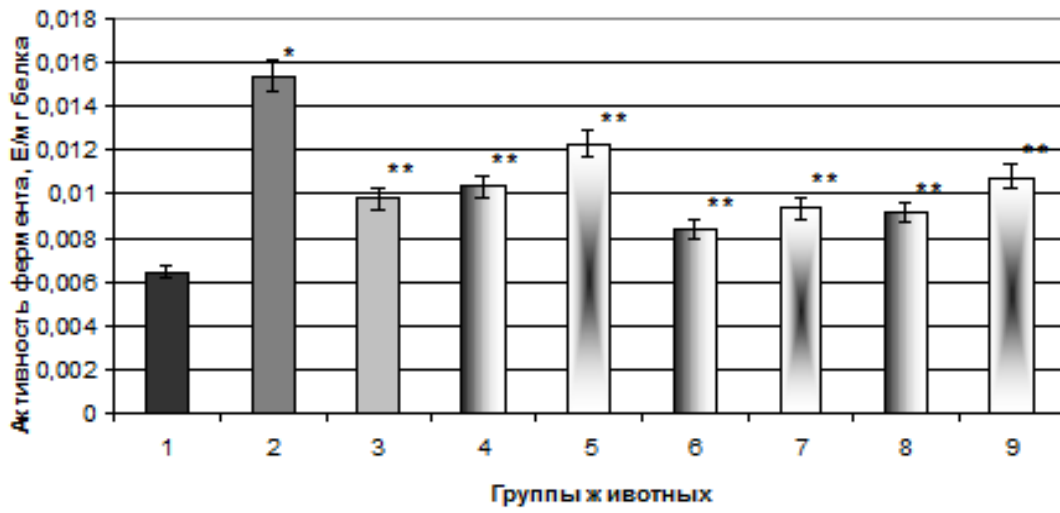
При введении НИПМГ в дозе 25 мг/кг животным с гипергликемией, вызванной введением протамин-сульфата, удельная активность ГП, ГР и ГТ снижалась в печени в 1,6, 1,4 и 1,2 раза, в почках – в 1,7, 1,3 и 1,7 раза, в сыворотке крови – в 2,5, 1,9 и 1,4 раза и в сердце – в 1,2, 1,3 и 1,4, изменяясь в сторону нормы (рис. 30, 32, 34). При введении ДКБ в той же дозе также было выявлено снижение удельной активности ГП, ГР и ГТ в печени на 43, 61 и 29%, в почках – на 43, 22 и 15%, в сыворотке крови – на 92, 65 и 43% (рис. 30, 32, 34). В сердце крыс, при этом, наблюдалось уменьшение удельной активности ГП на 15%, ГР и ГТ – на 29% соответственно относительно значений у животных с патологией, индуцированной протамин-сульфатом (рис. 30, 32, 34).

Введение бигуанидиновых производных (НИПМГ и ДКБ) в дозе 15 мг/кг на фоне развития гипергликемии, индуцированной стрептозоцином, у крыс сопровождалось снижением удельной активности ГП в печени в 2,1 и 1,5 раза, в почках – в 1,8 и 1,4 раза, в

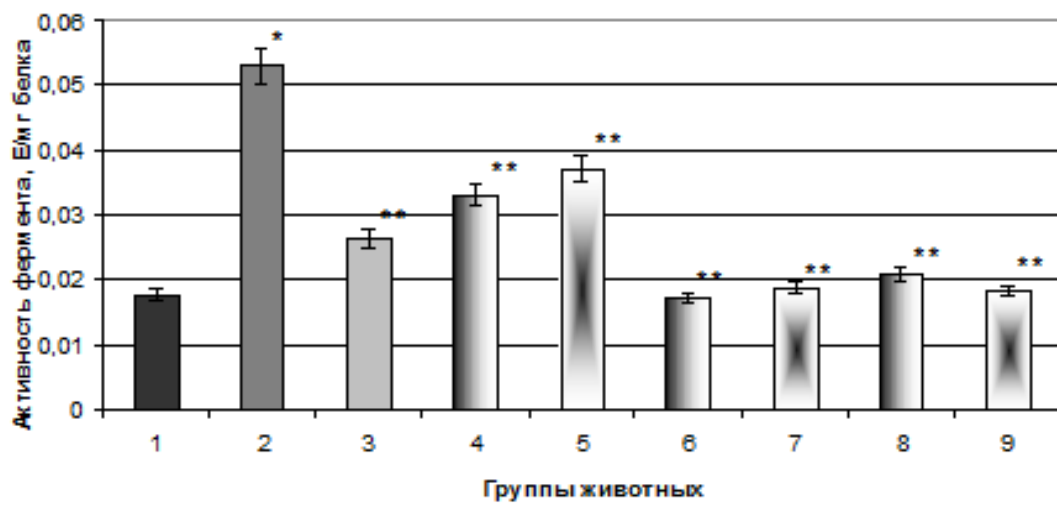
сыворотке крови – в 1,7 и 1,5 раза, в сердце – в 1,8 и 1,6 раза соответственно (рис. 31). Действие НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг приводило к изменению удельной активности ГР в сторону нормы, снижая ее в 1,6 и 1,5 раза в печени, в 1,7 и 1,2 раза в почках, в 2,6 и 1,6 раза в сыворотке крови и в 1,6 раза в сердце крыс (рис. 33). В ходе эксперимента были выявлены также изменения удельной активности ГТ при введении НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг крысам с гипергликемией, вызванной введением стрептозоцина: наблюдалось уменьшение активности фермента в печени в 1,4 и 1,2 раза, в почках – в 1,6 и 1,3 раза, в сыворотке крови – в 1,7 и 1,3 раза и в сердце крыс – в 1,6 и 1,2 раза (рис. 35). Что касается изменений активности ферментов глутатионовой АОС, выраженной в Е/г сырой массы тканей, на фоне введения НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг при реализации стрептозоциновой модели у крыс, то в печени наблюдалось уменьшение активности ГП в 2,2 и 1,4 раза, в почках – в 2,1 и 1,5 раза, в сердце – в 2,0 и 1,3 раза; активности ГР в печени и сердце – в 1,4 раза и в том и в другом случае, в почках – в 1,5 и 1,3 раза; активности ГТ в печени – в 1,5 и 1,3 раза, в почках – в 1,4 и 1,2 раза и в сердце – в 1,7 и 1,5 раза. Активность же ГП, ГР и ГТ, выраженная в Е/мл в сыворотке крови крыс снижалась при введении НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг в 2,3 и 1,8 раза; в 2,2 и 1,6 раза; в 1,6 и 1,4 раза (рис. 8, 10, 12 приложения).



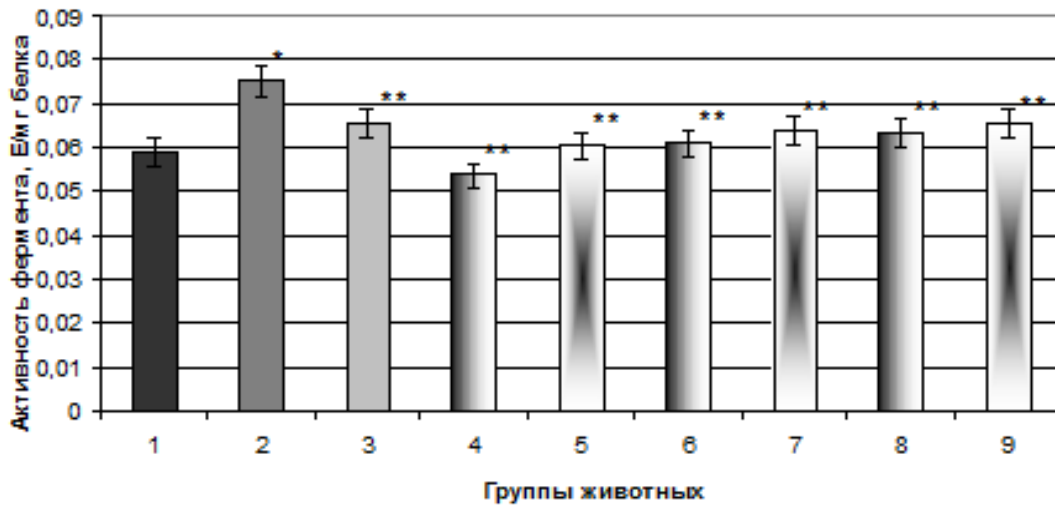
А



Б



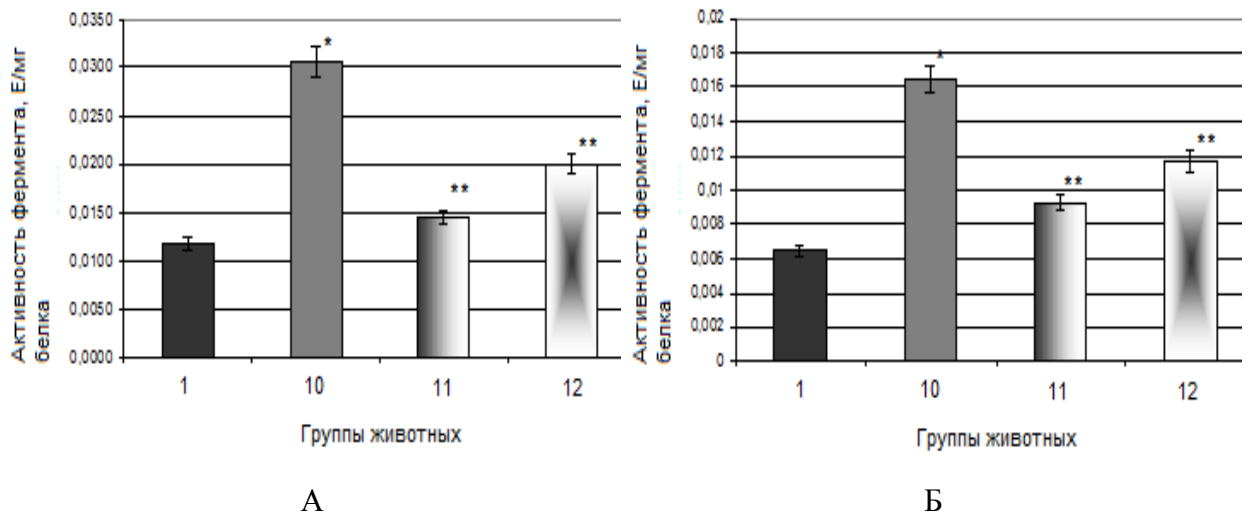
В



Г

Рис. 30. Удельная активность глутатионпероксидазы в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



А

Б

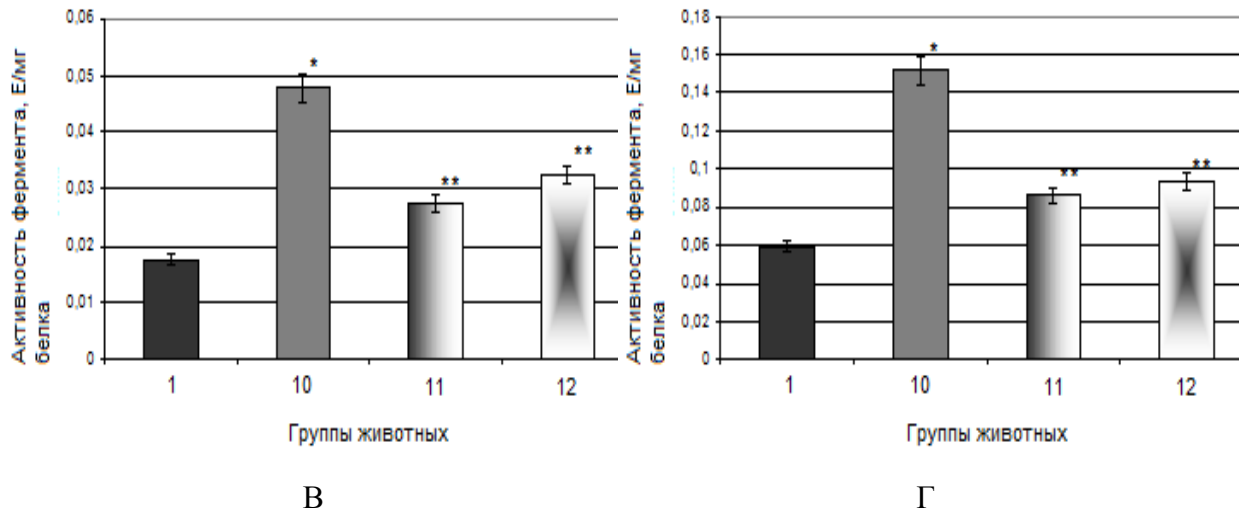
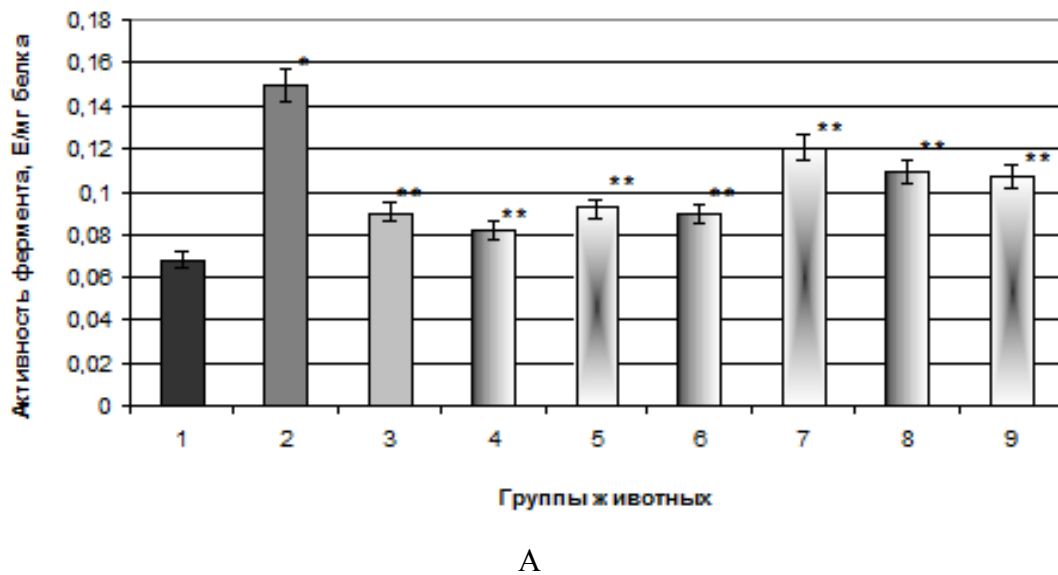
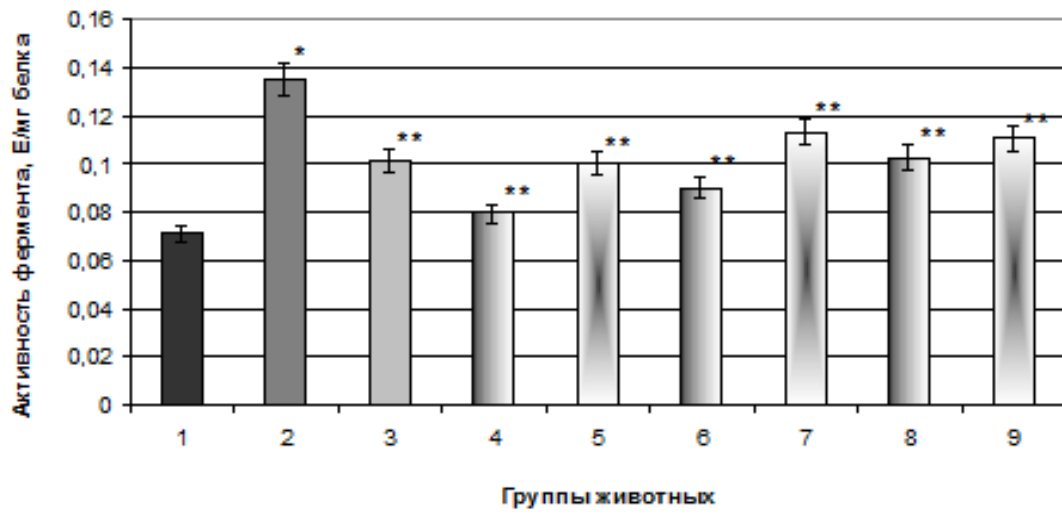


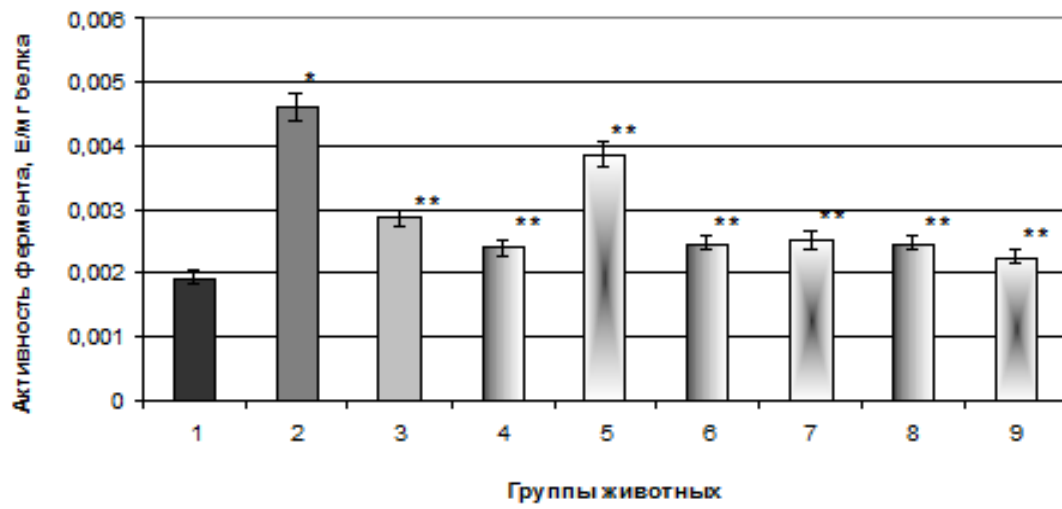
Рис. 31. Удельная активность глутатионпероксидазы в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии

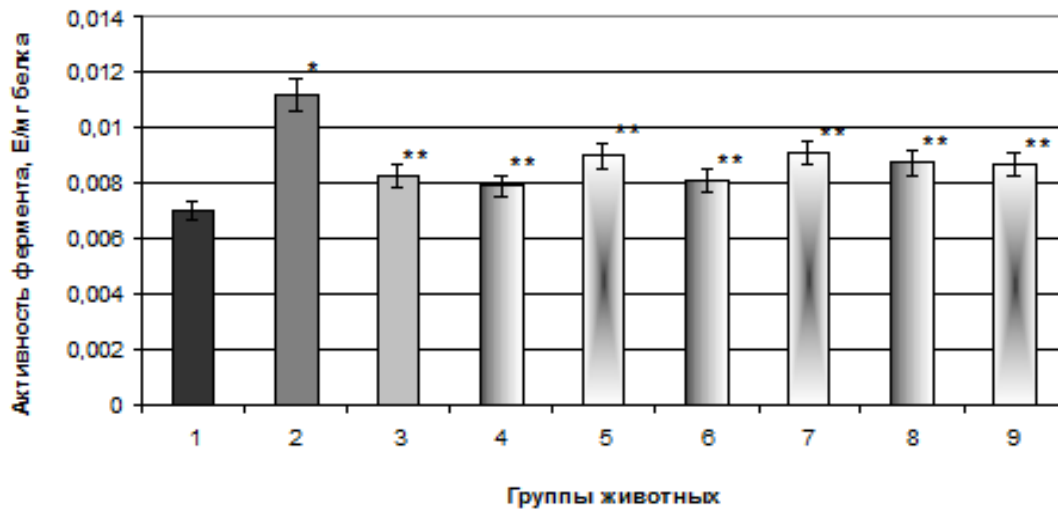




Б



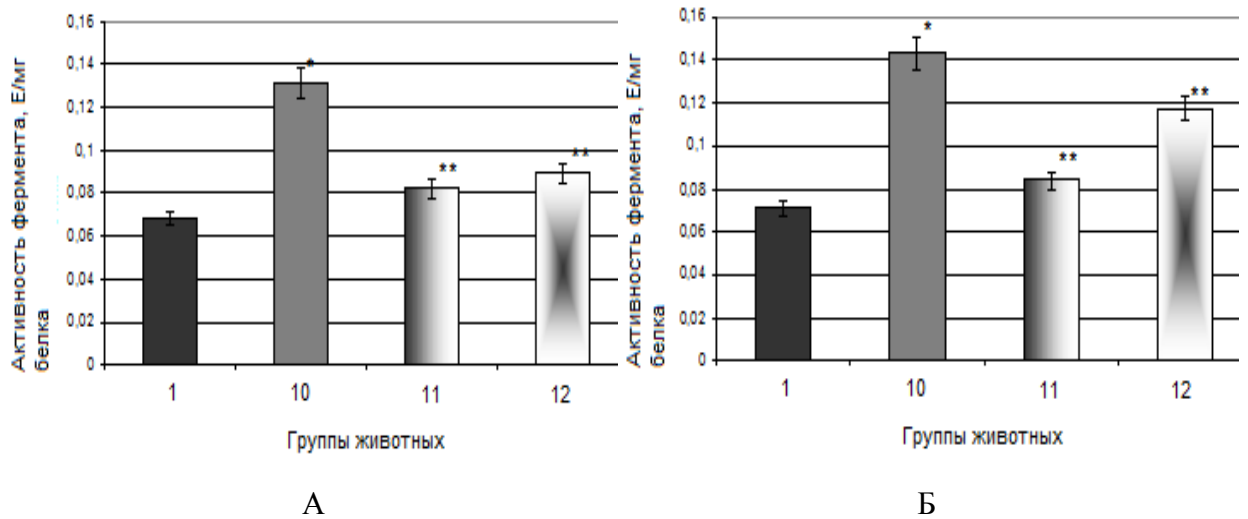
В



Г

Рис. 32. Удельная активность глутатионредуктазы в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



А

Б

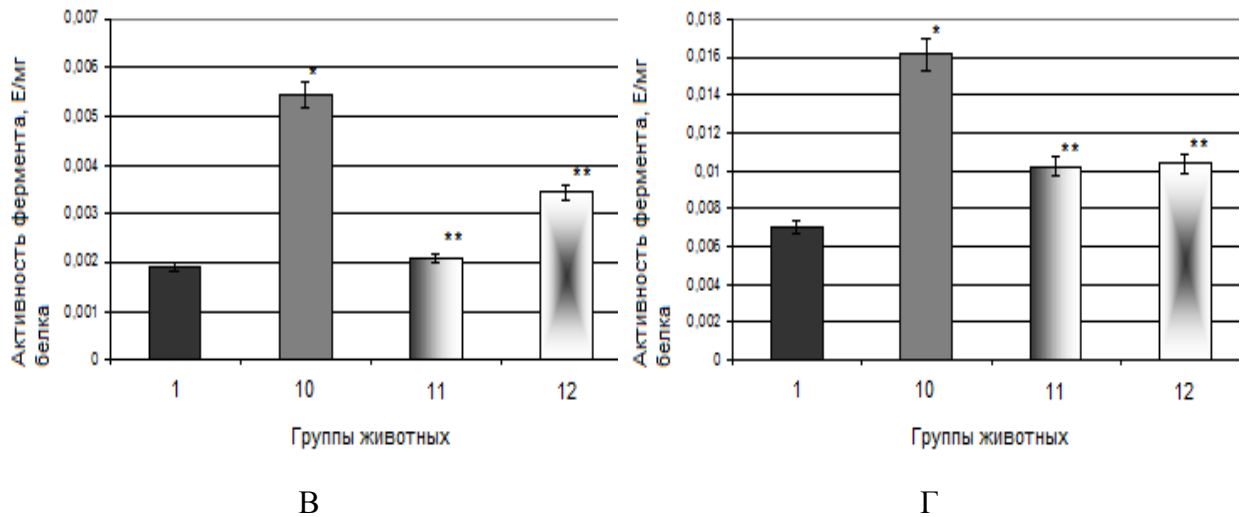
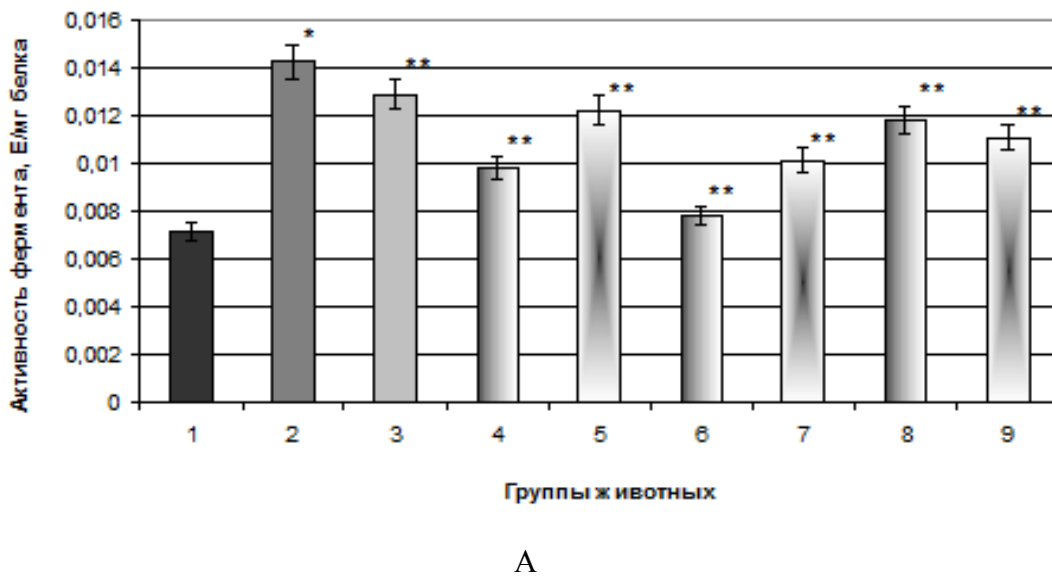
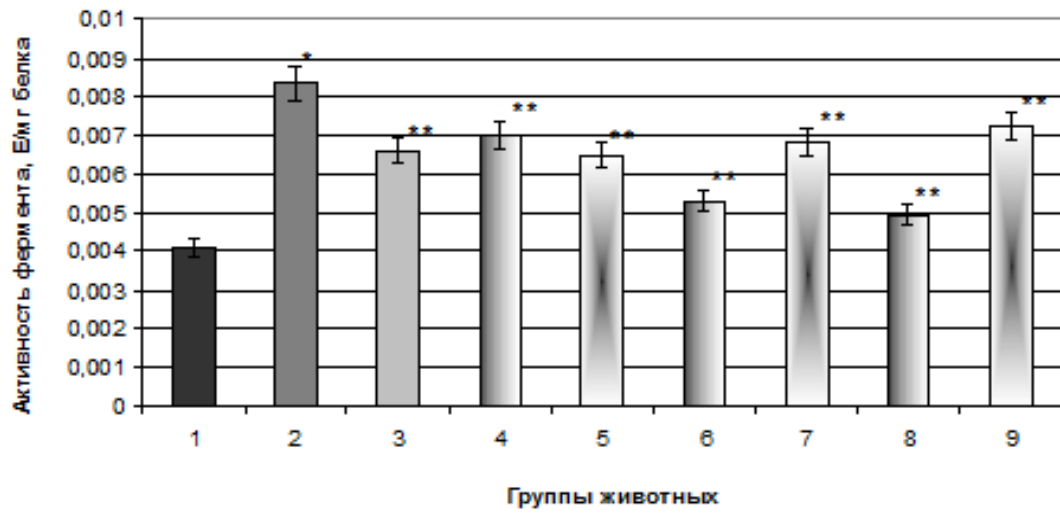


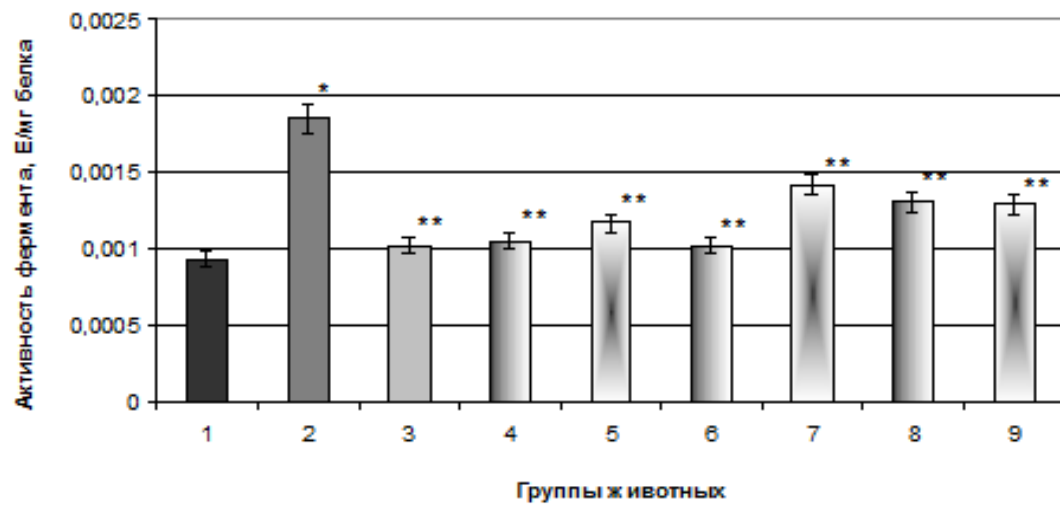
Рис. 33. Удельная активность глутатионредуктазы в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии

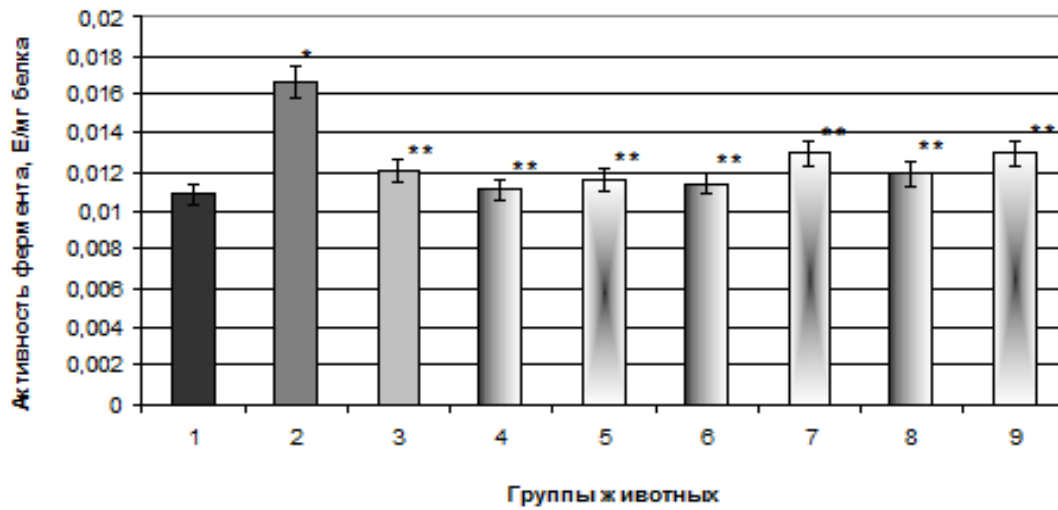




Б



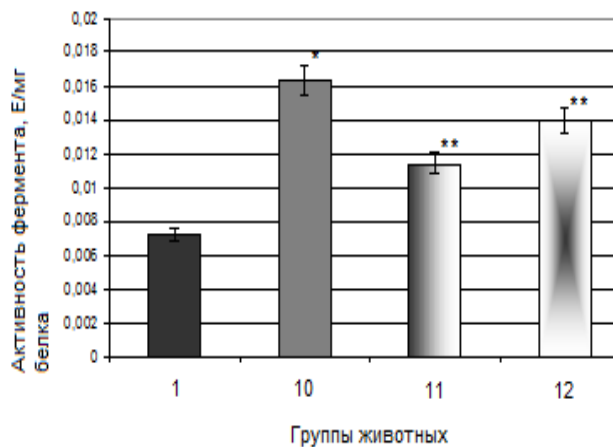
В



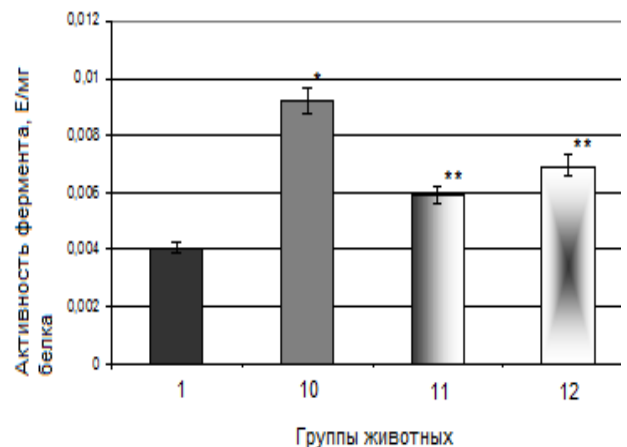
Г

Рис. 34. Удельная активность глутатионтрансферазы в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



А



Б

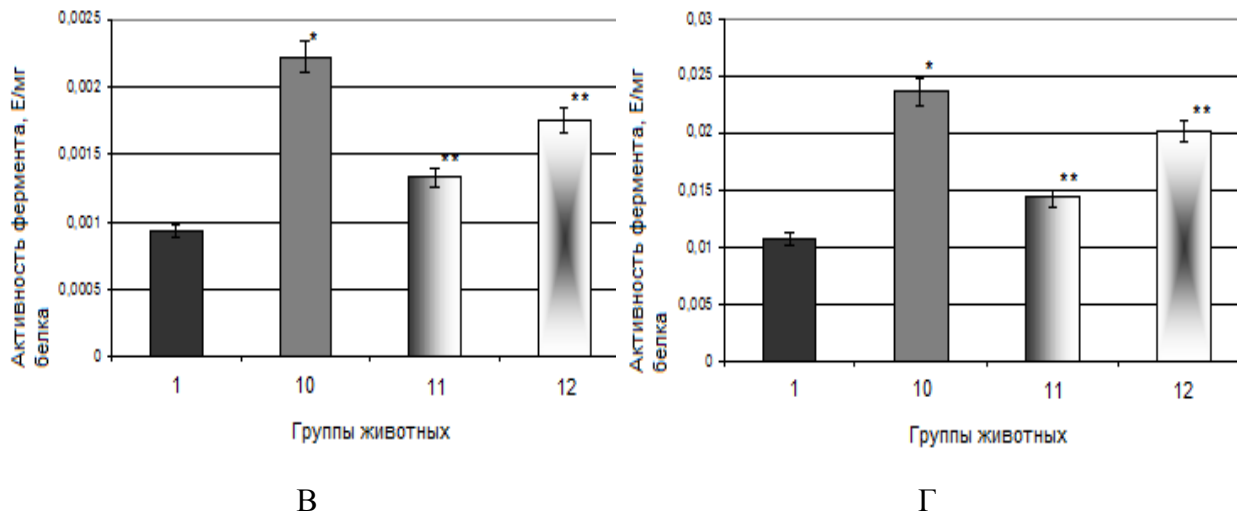


Рис. 35. Удельная активность глутатионтрансферазы в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

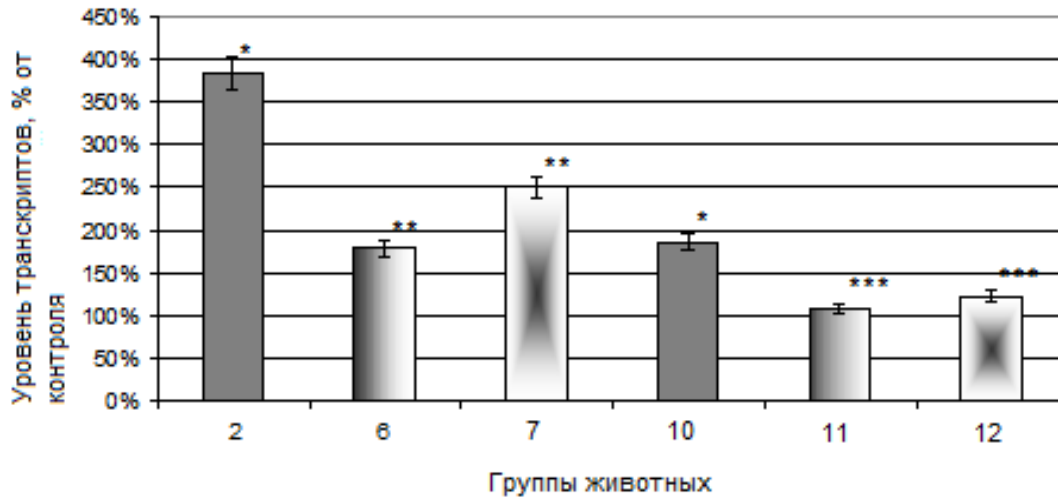
Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии

В этой связи следует отметить, что согласно литературным данным соединения бигуанидинового ряда способны проявлять антиоксидантные свойства через ингибирование процессов СО, в результате чего снижается уровень пероксидации липидов при СД2 и уменьшается расход глутатиона [166].

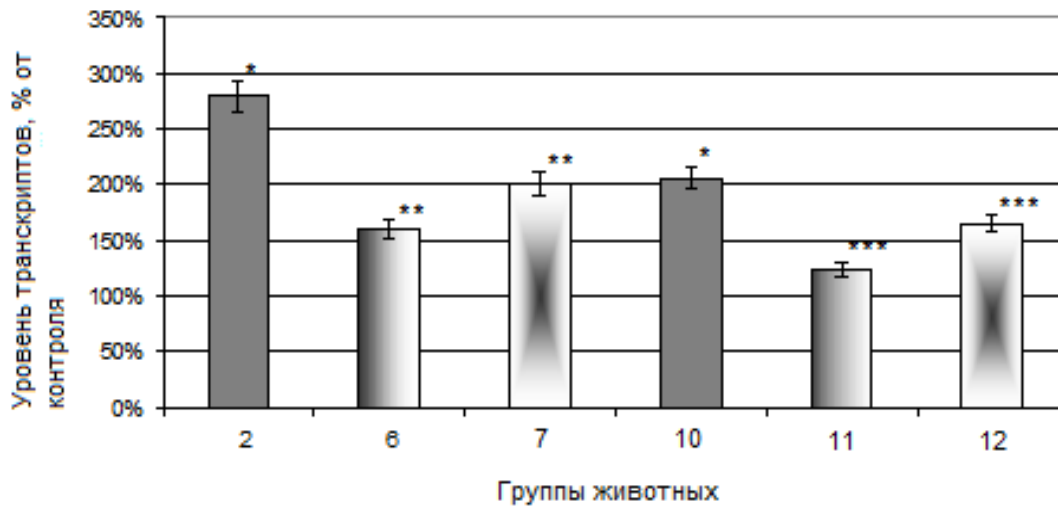
4.4. Уровень транскриптов генов глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в тканях крыс при введении бигуанидиновых производных на фоне развития гипергликемии

Наряду с увеличением активности ГП и ГР при развитии гипергликемии, индуцированной как введением протамина-сульфата, так и стрептозоцина, наблюдалось также и увеличение экспрессии генов данных антиоксидантных ферментов – *Gpx1* и *Gsr*. Так, в печени крыс с гипергликемией, вызванной введением протамина-сульфата, уровень транскриптов этих генов увеличивался в 3,9 и 2,2 раза, в почках – в 2,8 и 2,2 раза, и в сердце – в 2,1 и 2,9 раза по сравнению с группой контрольных животных (рис. 36-37). При реализации стрептозоциновой модели индукции гипергликемии у крыс выявлено увеличение экспрессии генов *Gpx1* и *Gsr* в печени в 1,9 и 2,0 раза, в почках – в 2,1 и 3,2 раза, и в сердце – в 1,7 и 4,4 раза соответственно по сравнению с нормой (рис. 36-37). Выявленные изменения уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов,

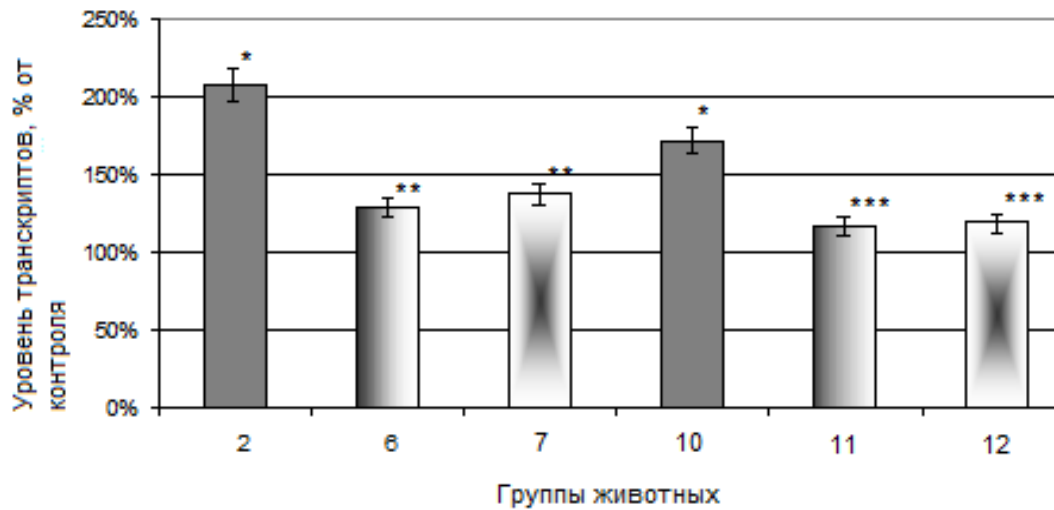
вероятно, можно рассматривать как адаптивную реакцию организма на увеличение образования АФК в условиях развития патологии. В этой связи следует отметить, что циркулирующий в плазме селенопротеин Р, содержание которого возрастает при СД2 [197], стимулирует экспрессию и увеличивает активность ГП [195].



А



Б

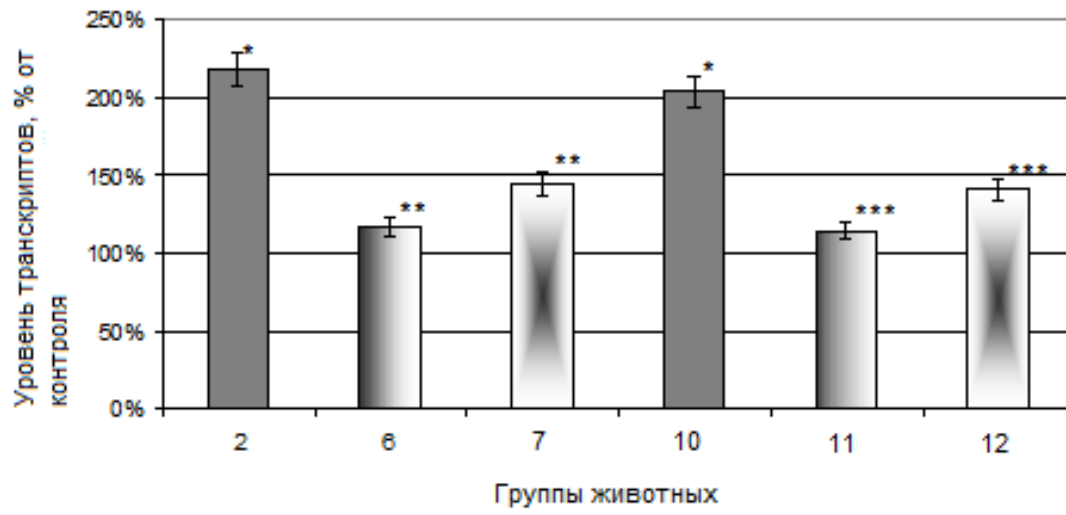


В

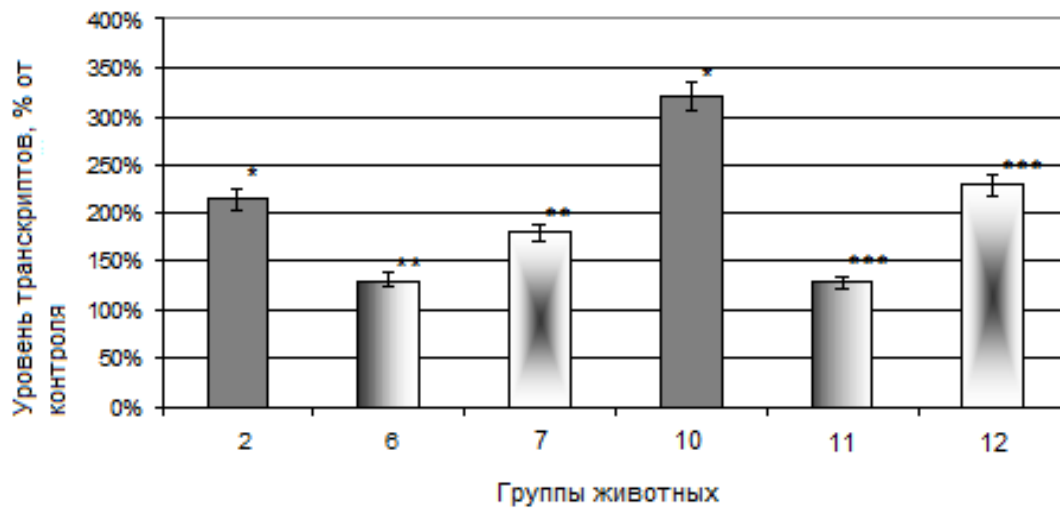
Рис. 36. Уровень транскриптов гена *Gpx1* в печени (А), почках (Б) и сердце (В) крыс с гипергликемией, индуцированной протамина-сульфатом (2), стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6, 11) и ДКБ (7, 12). Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, взятого за 100% ** - относительно показателей при гипергликемии, индуцированной протамина-сульфатом, *** - относительно показателей при гипергликемии, индуцированной стрептозоцином

На уровень транскриптов генов ГП и ГР на фоне развития гипергликемии у животных с гипергликемией, вызванной введением протамина-сульфата, в наибольшей степени оказывал влияние бигуанид НИПМГ. Так, при его введении в дозе 15 мг/кг крысам с патологией уровень транскриптов генов *Gpx1* и *Gsr* уменьшался в 2,2 и 1,9 раза в печени; в 1,7 и 1,6 раза в почках; в 1,6 и 1,7 раза в сердце относительно уровня при патологии (рис. 36-37). При введении ДКБ в дозе 15 мг/кг уровень транскриптов генов *Gpx1* и *Gsr* снижался на 53 и 51% в печени; на 39 и 19% в почках; на 52 и 53% в сердце соответственно (рис. 36-37).

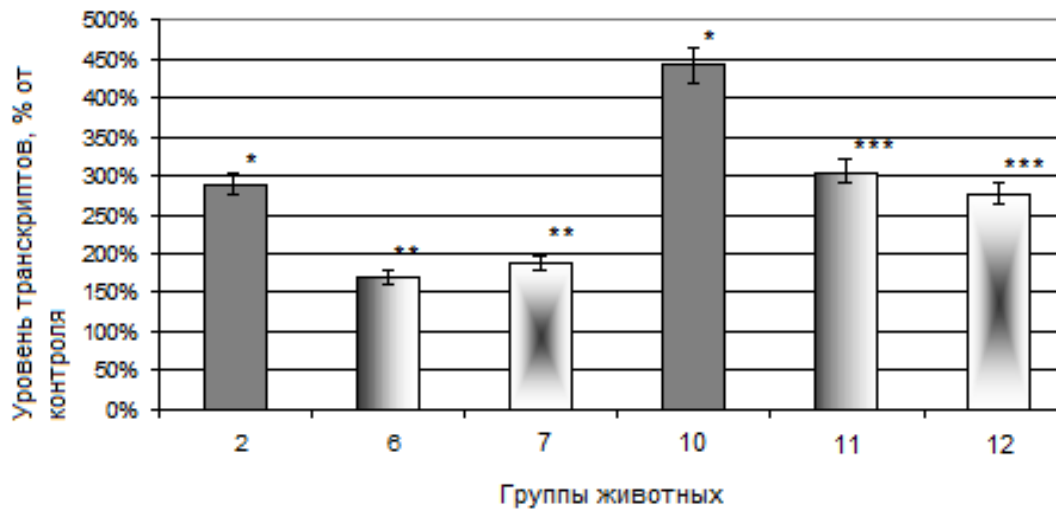
При введении НИПМГ в дозе 15 мг/кг животным с гипергликемией, вызванной введением стрептозоцина, экспрессия генов *Gpx1* и *Gsr* уменьшалась в печени в 1,7 и 1,8 раза, в почках – в 1,7 и 2,5 раза, и в сердце – в 1,5 раза относительно уровня при патологии (рис. 36-37). Экспрессия генов *Gpx1* и *Gsr* при действии ДКБ в той же дозе снижалась в печени в 1,5 и 1,4 раза, в почках – в 1,2 и 1,4 раза, в сердце – в 1,4 и 1,6 раза соответственно (рис. 36-37).



А



Б



В

Рис. 37. Уровень транскриптов гена *Gsr* в печени (А), почках (Б) и сердце (В) крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6, 11) и ДКБ (7, 12) *Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, взятого за 100% ** - относительно показателей при гипергликемии, индуцированной протамин-сульфатом, *** - относительно показателей при гипергликемии, индуцированной стрептозоцином*

Можно также предполагать, что снижение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов при гипергликемии под воздействием НИПМГ и ДКБ, очевидно, происходит в результате реализации антиоксидантного потенциала данных веществ, что отражается на экспрессии ферментов антиоксидантной защиты на транскрипционном уровне.

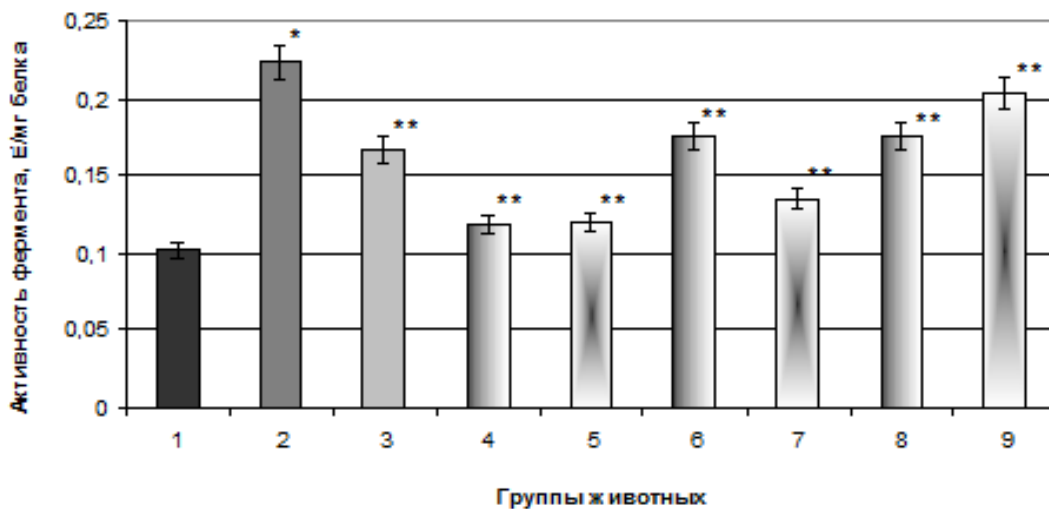
3.5.3. Воздействие N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина и 1,3-диметил 5-[(карбамимидамидометанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы в тканях и сыворотке крови экспериментальных животных при гипергликемии

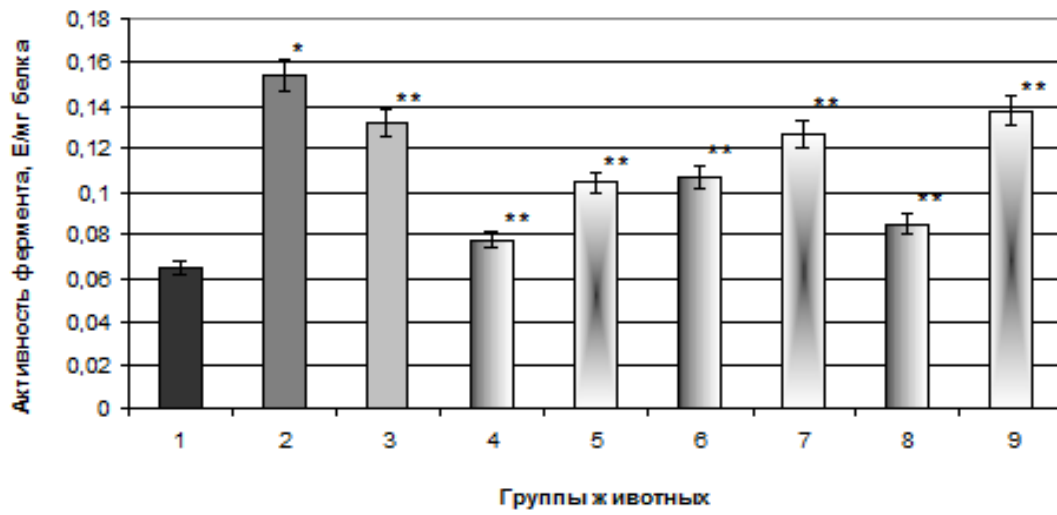
В ходе эксперимента было выявлено, что развитие гипергликемии сопровождается увеличением активности НАДФ-ИДГ по сравнению с нормой (рис. 38-39), (рис. 13-14 приложения). Так, при гипергликемии, индуцированной введением стрептозоцина, удельная активность НАДФ-ИДГ и активность, выраженная в Е/г сырой массы, увеличивалась в печени в 2,3 и 2,0 раза, в почках – в 2,1 и 1,9 раза, в сердце – в 2,1 и 1,8 раза. В сыворотке крови удельная активность фермента и активность, представленная в

Е/мл, увеличивалась в 2,3 и 2,0 раза (рис. 39), (рис. 14 приложения). Можно предполагать, что изменение активности данного фермента носит адаптивно-компенсаторный характер в ответ на возрастание расходов восстановления восстановительных эквивалентов глутатионовой АОС при интенсификации ОС на фоне гипергликемии.

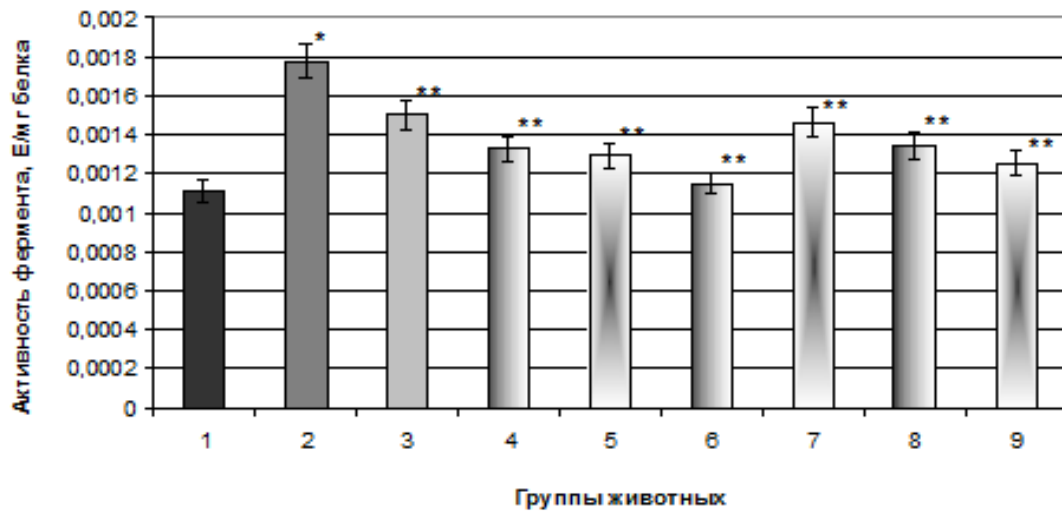
При введении исследуемых соединений крысам с гипергликемией наблюдалось уменьшение активности НАДФ-ИДГ по сравнению с данными в патологическом состоянии, вызванном введением протамин-сульфата (рис. 38), (рис. 13 приложения). Так, например, при действии метформина, НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг удельная активность фермента уменьшалась в печени на 34, 27 и 66%, в почках – на 17, 44 и 21%, в сыворотке крови – на 18, 55 и 21% и в сердце крыс – на 27, 74 и 29%. Удельная активность НАДФ-ИДГ при действии НИПМГ и ДКБ в дозе 10 мг/кг снижалась в печени на 88 и 86%, в почках на 98 и 48%, в сыворотке крови крыс на 34 и 37%, в сердце на 74 и 46%. В тканях животных при введении НИПМГ и ДКБ в дозе 25 мг/кг активность НАДФ-ИДГ становилась ниже уровня показателя при патологии на 27 и 10% в печени, 81 и 12% в почках, 33 и 42% в сыворотке крови и на 60 и 29% в сердце.

Подобные изменения удельной активности НАДФ-ИДГ были выявлены и при введении бигуанидиновых производных животным с патологией, вызванной действием стрептозоцина (рис. 39). Так, воздействие НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг приводило к уменьшению удельной активности НАДФ-ИДГ в печени в 1,6 и 1,5 раза, в почках – в 1,7 и 1,4 раза, в сыворотке крови – в 1,6 и 1,4 раза и в сердце – в 1,7 и 1,3 раза соответственно. При этом, также, наблюдалось снижение активности фермента, выраженной в Е/г сырой массы, в печени в 1,6 и 1,4 раза, в почках – в 1,8 и 1,5 раза, в сердце – в 1,6 и 1,4 раза, и активности, выраженной в Е/мл сыворотки крови – в 1,8 и 1,3 раза (рис. 14 приложения).

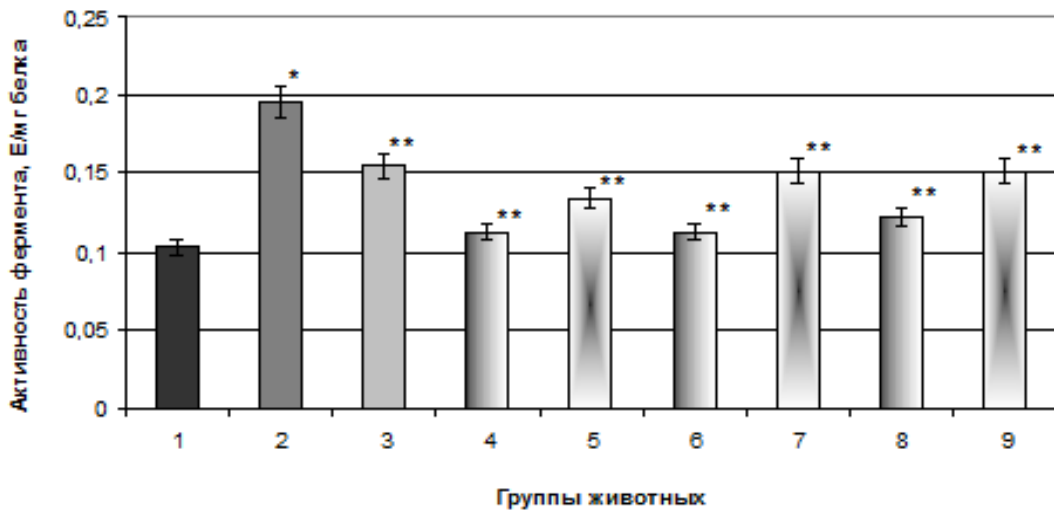




Б



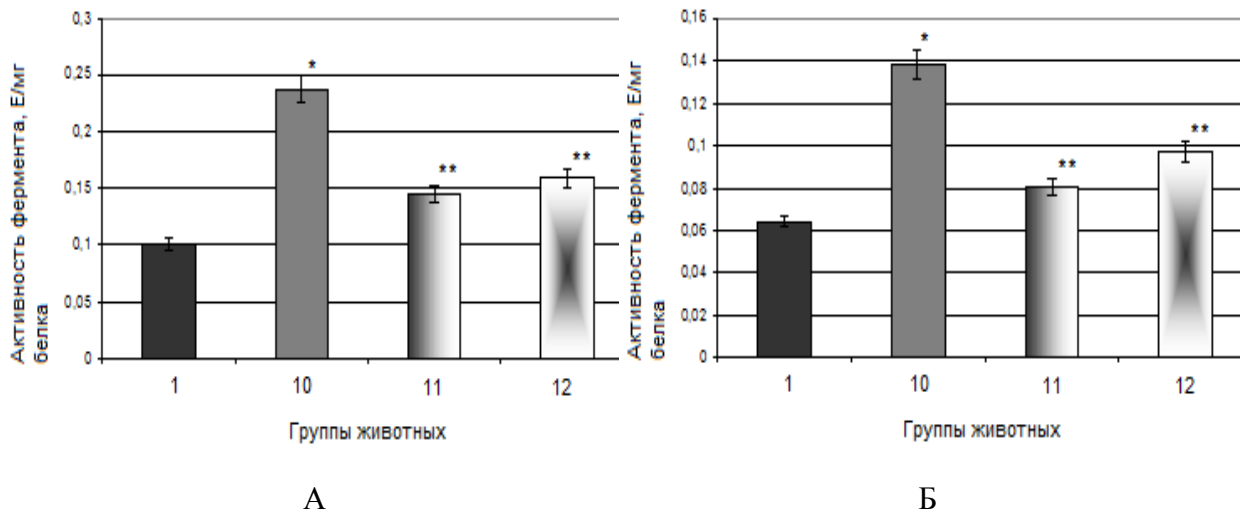
В



Г

Рис. 38. Удельная активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



А

Б

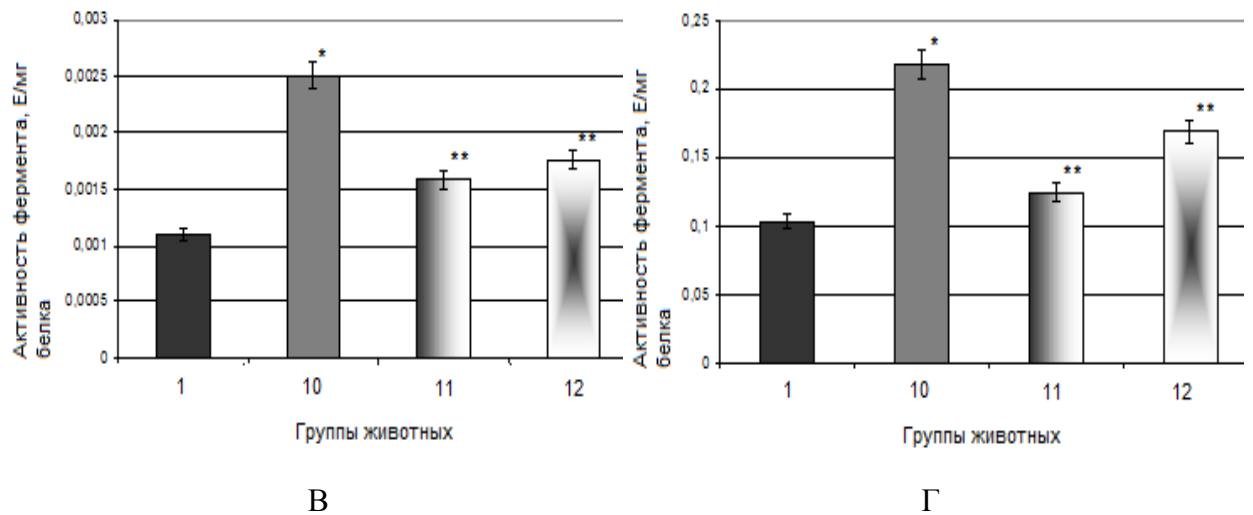


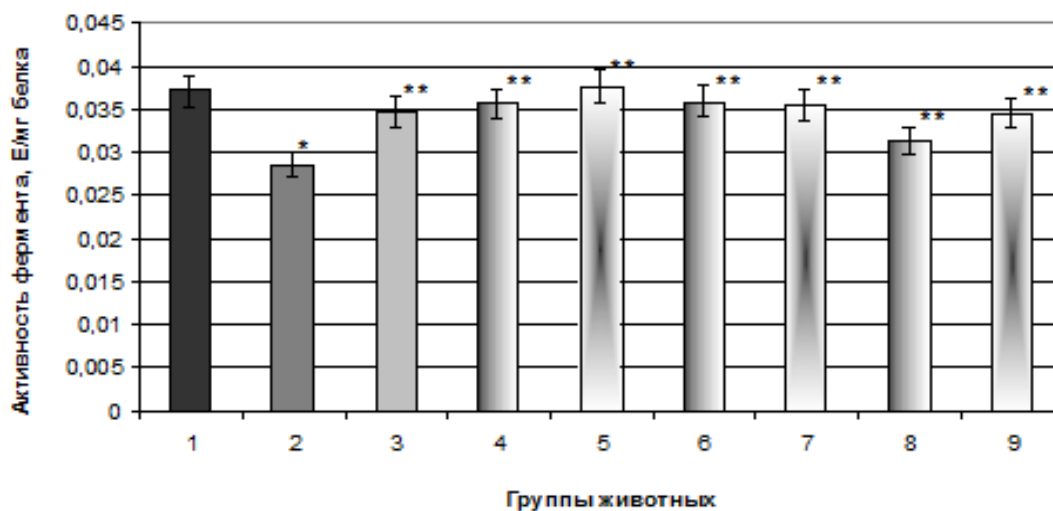
Рис. 39. Удельная активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии

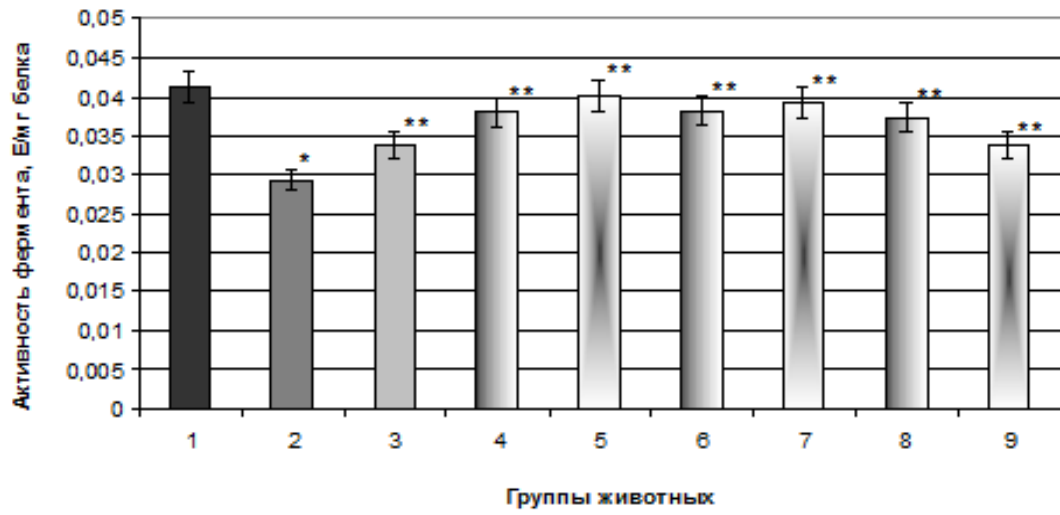
Установлено, что развитие гипергликемии сопровождается уменьшением активности Г6ФДГ (рис. 40-41), (рис. 15-16 приложения). При воспроизведении стрептозоциновой модели гипергликемии удельная активность Г6ФДГ снижалась в 2,5 раза в печени, в 2,1 раза в почках, в 3,2 раза в сыворотке крови и в 2,0 раза в сердце крыс с патологией относительно контрольных значений (рис. 41). Как известно, инсулинорезистентность при СД2 приводит к гипергликемии, глюкозурии и уменьшению содержания гликогена в печени. Мышечная ткань при этом утрачивает способность утилизировать глюкозу крови. В печени при общем снижении интенсивности биосинтетических процессов: биосинтеза белков, синтеза жирных кислот из продуктов распада глюкозы – наблюдается усиленный синтез ферментов глюконеогенеза [7]. В условиях недостаточности выработки инсулина главным образом возрастает активность фосфоенолпируваткарбоксикиназы, которая определяет скорость глюконеогенеза в печени и почках. Одну из ведущих ролей в нарушении регуляции метаболизма играет снижение уровня фруктозо-2,6-бисфосфата, что может служить причиной угнетения гликолиза и усиления глюконеогенеза. По-видимому, отмеченные нарушения метаболизма углеводов отражаются и на активности ключевого фермента ПФП – Г6ФДГ. Вероятно, в этих условиях снижение активности Г6ФДГ может быть сопряжено с торможением интенсивности ПФП, что связано с перераспределением глюкозо-6-фосфата

между различными путями метаболизма углеводов [98]. Кроме того, экспериментальные данные показывают, что в условиях гипергликемии может снижаться уровень экспрессии гена Г6ФДГ и активность фермента. С другой стороны, дефицит Г6ФДГ может стимулировать ОС, негативно влияя на секретирование инсулина β -клетками [109] или даже способствовать β -клеточному апоптозу [137].

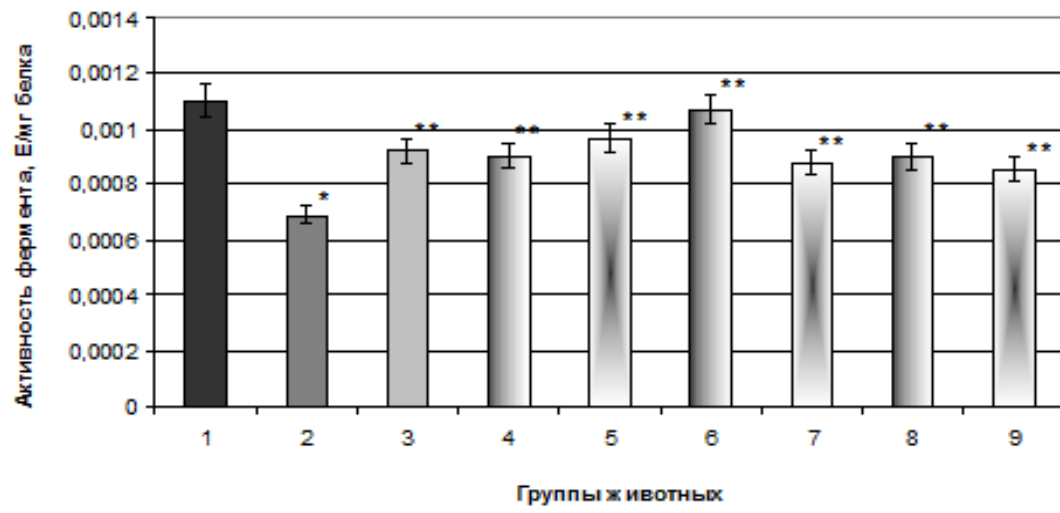
При введении НИПМГ в дозе 10 мг/кг крысам с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом, выявлено увеличение удельной активности Г6ФДГ в печени – в 1,2 раза, в почках, сыворотке крови и сердце – в 1,3 раза по сравнению с данными при гипергликемии (рис. 40). Введение препарата сравнения в дозе 15 мг/кг увеличивало удельную активность Г6ФДГ в печени, почках и сердце крыс – в 1,2 раза и в сыворотке крови – в 1,3 раза соответственно (рис. 40). При действии НИПМГ в дозе 15 и 25 мг/кг активность Г6ФДГ возрастала в печени в 1,3 и 1,1 раза, почках - в 1,3 раза при введении и той, и другой дозы, в сыворотке крови крыс в 1,6 и 1,3 раза, и сердце - в 1,2 и 1,3 раза (рис. 40). Введение ДКБ крысам с гипергликемией оказывало сходное влияние на удельную активность Г6ФДГ в исследуемых тканях (рис. 40). Так, в печени активность фермента увеличивалась при введении ДКБ в дозе 10 мг/кг в 1,3 раза, а в дозах 15 и 25 мг/кг – в 1,2 раза, в почках и сыворотке крови в дозе 10 мг/кг – в 1,4 раза, в дозе 15 мг/кг - в 1,3 раза и в дозе 25 мг/кг – в 1,2 раза; в сердце во всех исследуемых дозах – в 1,2 раза. Изменения активности Г6ФДГ, выраженной в Е/г сырой массы тканей и в Е/мл сыворотки крови, при введении бигуанидиновых производных на фоне реализации протамин-сульфатной модели гипергликемии имели схожий характер (рис. 15 приложения).



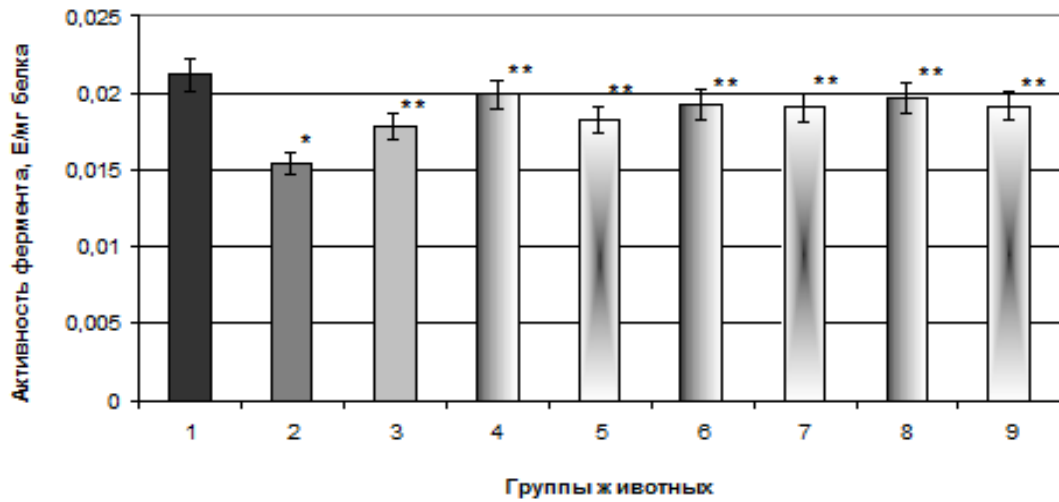
А



Б



В

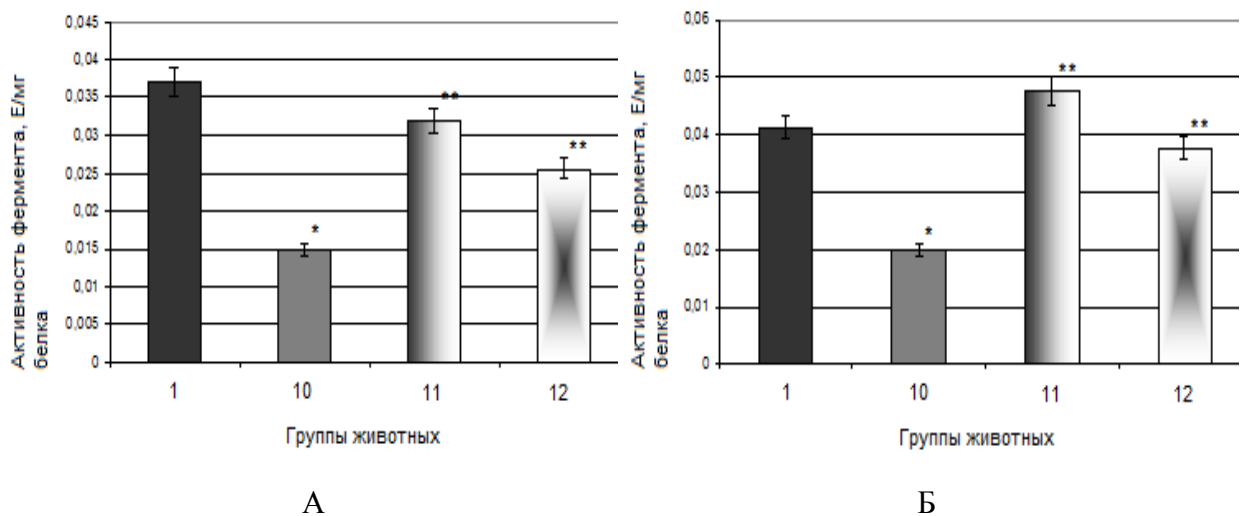


Г

Рис. 40. Удельная активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии

Наряду с этим, отмечено возрастание активности Г6ФДГ при введении бигуанидиновых производных на фоне развития гипергликемии, индуцированной стрептозоцином (рис. 41), (рис. 16 приложения).



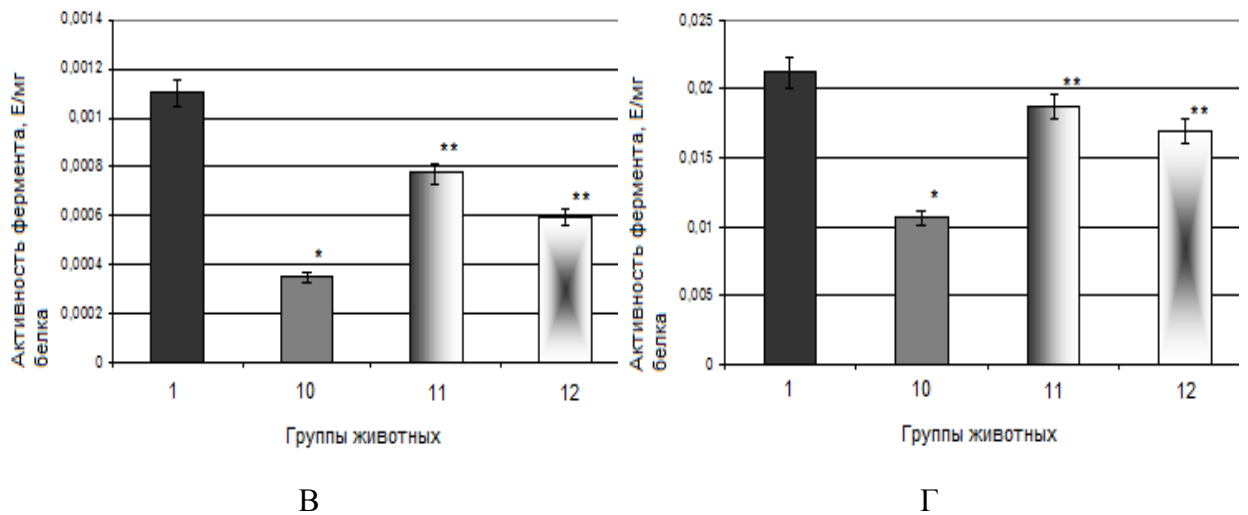


Рис. 41. Удельная активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в печени (А), почках (Б), сыворотке крови (В) и сердце (Г) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, вызванной введением стрептозоцина (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии

Так, при введении НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг животным с гипергликемией, удельная активность Г6ФДГ возросла в печени в 2,1 и 1,7 раза, в почках – в 2,4 и 1,9 раза, в сыворотке крови – в 2,2 и 1,7 раза и в сердце – в 1,8 и 1,6 раза относительно данных при патологии, индуцированной введением стрептозоцина (рис. 41). Наряду с этим, активность Г6ФДГ, выраженная в Е/г сырой массы тканей, возросла в печени в 1,9 и 1,8 раза, в почках – в 1,7 и 1,5 раза, в сердце - в 1,5 и 1,3 раза (рис. 16 приложения). В сыворотке крови активность фермента, выраженная в Е/мл, при введении бигуанидиновых производных животным с гипергликемией увеличилась в 1,6 и 1,4 раза (рис. 16 приложения). Полученные результаты относительно изменений активности исследуемого НАДФН-продуцирующего фермента согласуются с литературными данными, согласно которым метформин повышал активность Г6ФДГ на фоне высоко-жировой модели индукции инсулинорезистентности [94, 172].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время считается общепризнанным, что окислительный стресс является неотъемлемым неспецифическим звеном в развитии состояния дезадаптации и возникновения патологии. В связи с этим поиск веществ с антиоксидантной активностью, способных обеспечивать поддержку функционирования АОС организма в условиях интенсивного образования АФК, является актуальной задачей. Проведенные исследования направлены на решение фундаментальной проблемы биохимии, связанной с регуляцией состояния свободнорадикального гомеостаза и оценкой эффективности применения веществ, являющихся потенциальными предшественниками новых лекарственных средств. В ходе эксперимента были протестированы НИПМГ и ДКБ – синтетические бигуанидиновые производные, которые были отобраны с помощью программы прогноза «структура-свойство» PASS, доступной в режиме on-line по адресу <http://www.ibmh.msk.su/pass> с предполагаемой антиоксидантной и антидиабетической активностью при гипергликемии, индуцированной введением протамин-сульфата и развивающейся под действием стрептозоцина на фоне жировой диеты у крыс.

При изучении острой токсичности бигуанидиновых производных при внутрибрюшинном введении экспериментальным животным были выявлены среднелетальные дозы: ЛД₅₀ (НИПМГ) = 561,7±28,1 мг/кг, ЛД₅₀ (ДКБ) = 620,6±31,0 мг/кг. С учетом полученных значений НИПМГ и ДКБ можно отнести к классу малотоксичных соединений [12].

Согласно результатам исследования, развитие гипергликемии у крыс подтверждается увеличением содержания глюкозы в экспериментальных моделях ее индукции как при введении протамин-сульфата, так и стрептозоцина после жировой диеты. На фоне развития патологии активируются процессы СО биосубстратов, что сопровождается возрастанием параметров биохемилюминесценции, повышением содержания первичных продуктов ПОЛ – ДК, и увеличением уровня карбонильных групп модифицированных белков. Наряду с этим происходила мобилизация компонентов АОС. При введении бигуанидиновых производных было выявлено снижение параметров, отражающих интенсивность СРП. Так, при действии исследуемых соединений на фоне развития гипергликемии имело место снижение параметров БХЛ – S, I_{max} и tgα₂ в печени, почках, сердце и сыворотке крови крыс. Антиоксидантный эффект НИПМГ и ДКБ подтверждается и изменением уровня ДК в сторону контроля при введении бигуанидов животным с гипергликемией, вызванной как введением протамин-сульфата, так и стрептозоцина. Следует отметить, что при воздействии исследуемых веществ на фоне

развития патологического состояния снижался также уровень окислительной модификации белков и степени фрагментации ДНК.

Установлено, что под воздействием бигуанидиновых производных происходило уменьшение степени мобилизации компонентов АОС по сравнению с патологией, что может объясняться проявлением ими антиоксидантных свойств. Об этом свидетельствует снижение общей антиоксидантной активности, оцениваемой по значениям такого параметра БХЛ, как тангенс угла падения кинетической кривой. Полученные данные подтверждаются и измерением активности и содержания отдельных компонентов АОС. При введении НИПМГ и ДКБ животным с гипергликемией при воспроизведении различных экспериментальных моделей наблюдалось изменение в сторону контрольных значений удельной активности СОД и каталазы в печени, почках, сердце и сыворотке крови крыс. Вероятно, исследуемые бигуаниды проявляли антиоксидантные свойства, что в результате приводило к снижению степени образования АФК, и, как следствие, нормализации работы АОС. По-видимому, данные соединения можно рассматривать как антиоксиданты прямого действия из-за наличия в их структуре бигуанидинового фрагмента и пиперединового гетероцикла, проявляющего электронно-донорные свойства, что обеспечивает возможность смещения электронной плотности в сторону бигуанидинового фрагмента, ответственного за взаимодействие со свободными радикалами.

Воздействие бигуанидиновых производных сопровождалось и сдвигом активности ГП, ГР и ГТ в сторону нормы. Также, в тканях экспериментальных животных с патологией, которым вводили НИПМГ и ДКБ, происходило возрастание концентрации восстановленного глутатиона по сравнению с группой крыс с гипергликемией. Полученные результаты согласуются с имеющимися литературными данными, согласно которым соединения бигуанидинового ряда способны проявлять антиоксидантные свойства через ингибирование процессов СО, в результате чего снижается уровень пероксидации липидов при гипергликемии и уменьшается расход глутатиона [166]. В этих условиях отмечено также возрастание активности АГ, существенно снижающейся при патологии. При введении НИПМГ и ДКБ на фоне развития гипергликемии было выявлено изменение концентрации цитрата в сторону контроля.

Использование метода ПЦР в режиме реального времени позволило оценить изменение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов. Показано, что применение бигуанидиновых производных в качестве протекторов при гипергликемии приводило к снижению уровня транскриптов генов *Sod1*, *Cat*, *Gpx1* и *Gsr*, возрастающего в данном патологическом состоянии в исследуемых тканях крыс, что согласуется с

результатами определения активности соответствующих антиоксидантных ферментов. Известно, что гены СОД, каталазы и ГП имеют в области промотора сайт связывания для редокс-чувствительного транскрипционного ядерного фактора NF-κB [146], который контролирует экспрессию ряда генов, играющих важную роль в ответе на стресс. Кроме того, транскрипция гена ГР находится в зависимости от степени восстановленности транскрипционного фактора OxyR [49]. Активация данного белка под действием пероксида водорода стимулирует синтез порядка 30 ферментов, в том числе и ГР. Введение исследуемых веществ снижало интенсивность СРП, что, по-видимому, могло уменьшать активацию указанных факторов и, как следствие, уровень транскрипции антиоксидантных ферментов. Из этого можно сделать вывод о том, что изменение каталитической активности СОД, каталазы, ГП и ГР под действием бигуанидиновых производных может быть обусловлено снижением скорости их синтеза.

Функционирование глутатионовой АОС сопряжено с постоянным поступлением в систему восстановительных эквивалентов, генерирование которых осуществляют ферменты НАДФ-ИДГ и Г6ФДГ. В ходе экспериментальных исследований было показано, что введение бигуанидиновых производных приводило к снижению активности НАДФ-ИДГ, возрастающей при развитии патологии, в исследуемых тканях животных. Отмечено, что активность Г6ФДГ снижалась при гипергликемии, что может быть связано со сдвигами метаболизма, характерными для данной патологии. Известно, что при СД снижена интенсивность функционирования пентозофосфатного пути [98]. Это, вероятно, связано с подавлением синтеза глюкокиназы и индукцией глюкозо-6-фосфатазы в печени, вследствие чего уменьшается доступность глюкозо-6-фосфата для Г6ФДГ [55]. Введение бигуанидиновых производных способствовало изменению активности фермента в сторону контрольных значений. Применение НИПМГ и ДКБ на фоне развития экспериментальной гипергликемии увеличивало активность Г6ФДГ, снижающуюся у животных с гипергликемией. По-видимому, торможение процессов СО биомолекул под действием бигуанидиновых производных оказывает позитивное воздействие на функционирование НАДФН-генерирующих ферментов.

Тем самым, в ходе данной работы была подтверждена возможность проявления НИПМГ и ДКБ антиоксидантной и антигипергликемической активности. Вместе с тем, полученные данные свидетельствуют о более выраженном антиоксидантном действии НИПМГ и ДКБ по сравнению с препаратом сравнения метформином, что может быть использовано в дальнейшем для доклинических и клинических исследований с целью расширения спектра препаратов, применяемых для лечения СД2.

На основании полученных результатов представлена гипотетическая схема, отражающая воздействие бигуанидиновых производных на антиоксидантный статус крыс при развитии экспериментальной гипергликемии (рис. 42). Так, введение крысам протамин-сульфата и стрептозоцина на фоне жировой диеты способствовало устойчивому увеличению содержания глюкозы в крови крыс. Развитие гипергликемии было сопряжено с инициацией ряда патогенетических процессов, приводящих к чрезмерному образованию АФК и нарастанию окислительного стресса. Под воздействием свободных радикалов происходила интенсификация процессов СО биомолекул, в частности ПОЛ, ОМБ и фрагментация ДНК, наблюдалось угнетение активности АГ и накопление цитрата. Компенсаторным адаптивным ответом на окислительный стресс при гипергликемии было увеличение активности и содержания компонентов антиоксидантной защиты. Введение НИПМГ и ДКБ, по-видимому, приводило к нормализации свободнорадикального гомеостаза за счет реализации антиоксидантного и антидиабетического потенциала данных соединений.

Таким образом, действие НИПМГ и ДКБ может проявляться на молекулярном уровне – бигуанидиновые производные способны выступать в качестве ловушки для свободных радикалов, тем самым снижая интенсивность свободнорадикальных процессов при гипергликемии и соответственно нагрузку на антиоксидантное звено, на клеточном уровне – препятствуя развитию апоптотических процессов при патологии, а также на тканевом и системном уровнях – повышая чувствительность тканей к действию инсулина и тем самым, снижая уровень гликемии у крыс.

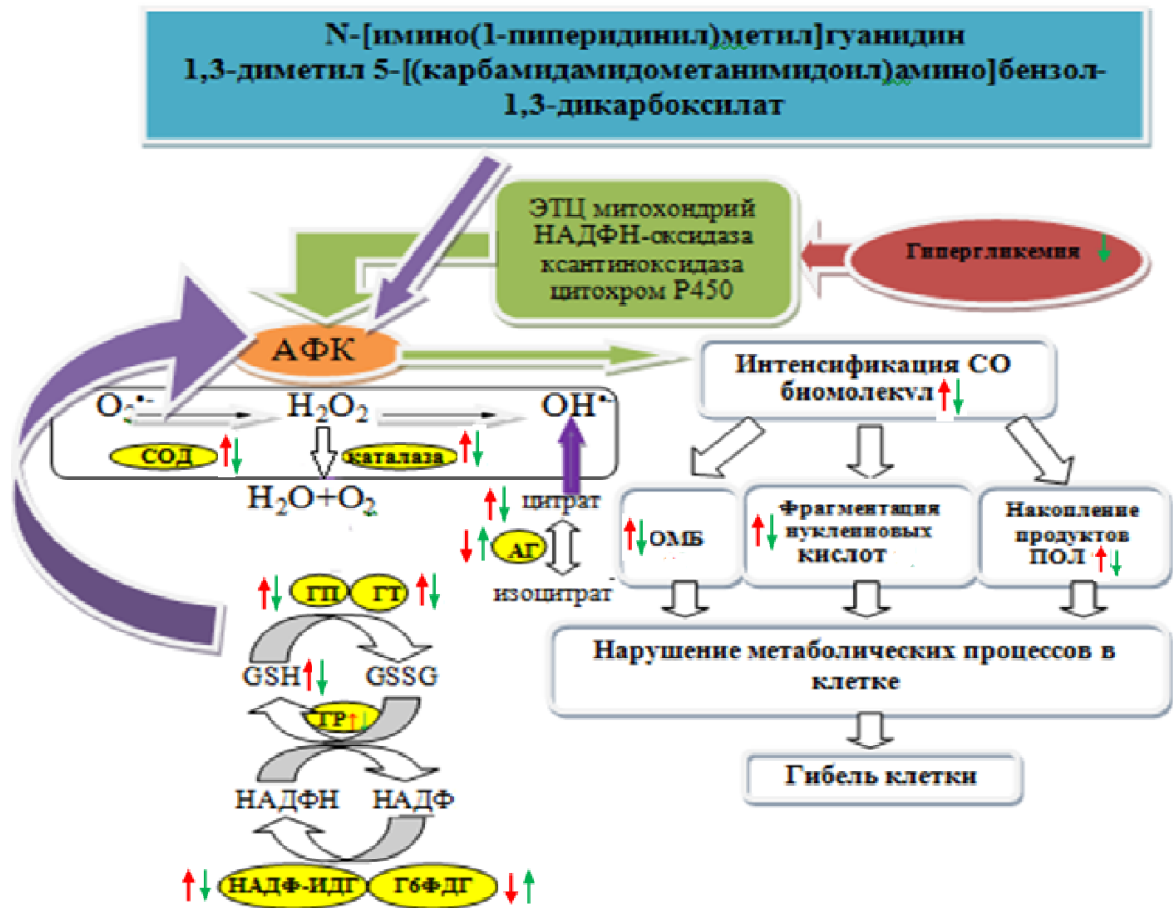


Рис. 42. Гипотетическая схема воздействия бигуанидиновых производных НИПМГ и ДКБ на антиоксидантный статус при гипергликемии в эксперименте на животных

Условные обозначения: $\downarrow\uparrow$ - изменение параметра при гипергликемии;

$\uparrow\downarrow$ - изменение параметра при введении бигуанидиновых производных крысам с гипергликемией;

\blacktriangleright - антиоксидантный эффект.

ВЫВОДЫ

1. Введение N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина (НИПМГ) и 1,3-диметил 5-[(карбамимидамометанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата (ДКБ) во всех исследуемых дозах (10, 15, 25 мг/кг) приводило к снижению концентрации глюкозы в сыворотке крови крыс, возрастающей при патологии, вызванной с помощью протамин-сульфатной и стрептозоциновой моделей гипергликемии. Эффекты НИПМГ, ДКБ и препарата сравнения (метформин) имели сопоставимый характер. Так, НИПМГ в дозе 10 мг/кг, также как метформин, приводил к снижению уровня гипергликемии в 2,6 раза.
2. Согласно результатам оценки токсичности НИПМГ и ДКБ, данные вещества можно отнести к классу малотоксичных соединений. Определены среднелетальные дозы для НИПМГ – $561,7 \pm 28,1$ мг/кг, для ДКБ – $620,6 \pm 31,0$ мг/кг.
3. Введение НИПМГ и ДКБ на фоне гипергликемии сопровождается снижением уровня свободнорадикальных процессов, что подтверждается уменьшением концентрации диеновых конъюгатов, степени окислительной модификации белков и параметров биохемилюминесценции (БХЛ) – S и I_{\max} , в тканях экспериментальных животных. Установлено также, что при действии бигуанидиновых производных увеличивается активность аконитатгидратазы, существенно снижающаяся при развитии гипергликемии. Препарат сравнения оказывал подобное действие, однако, менее выраженное в отношении ряда показателей.
4. Введение исследуемых бигуанидов крысам с гипергликемией, индуцированной действием как протамин-сульфата, так и стрептозоцина, способствует существенному снижению степени фрагментации ДНК, имеющей место при патологии.
5. При введении НИПМГ и ДКБ экспериментальным животным с гипергликемией параметр БХЛ $\text{tg}\alpha_2$, отражающий общую антиоксидантную активность, а также активность ряда антиоксидантных ферментов (СОД, каталазы, ГП, ГР и ГТ) изменяется в сторону контрольных значений. Причем эффект бигуанидиновых производных в большинстве случаев имеет более выраженный характер по сравнению с препаратом сравнения – метформином.
6. Действие бигуанидиновых производных при гипергликемии, индуцированной как протамин-сульфатом, так и стрептозоцином на фоне жировой диеты, сопровождается снижением уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов. Так, при введении НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг уровень транскриптов

гена *Sod1* в печени крыс с гипергликемией снижается в 1,7 и 1,2 раза, *Cat* - в 1,8 и 1,6 раза, *Gpx1* - в 2,2 и 1,5 раза, *Gsr* - в 1,9 и 1,5 раза, что согласуется с результатами определения активности соответствующих ферментов.

7. Выявлено, что введение исследуемых бигуанидиновых производных на фоне как протамин-сульфатной, так и стрептозоциновой модели индукции гипергликемии, приводило к нормализации уровня компонентов неферментативного звена антиоксидантной системы – цитрата и глутатиона, в тканях, а также сыворотке крови экспериментальных животных. Так, при действии НИПМГ, ДКБ и метформина в дозе 15 мг/кг выявлено снижение уровня цитрата в 2,3, 2,0 и 1,6 раза соответственно относительно данных при патологии.
8. При тестировании НИПМГ, ДКБ и препарата сравнения в качестве протекторов у крыс с гипергликемией отмечено изменение активности НАДФН-продуцирующих ферментов (Г6ФДГ, НАДФ-ИДГ) в направлении контроля.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абатуров А.Е. Роль механизмов антиоксидантной системы в развитии заболеваний органов дыхания // А.Е. Абатуров, А.П. Волосовец, Т.П. Борисова // Здоровье ребенка. – 2017. – Т. 12, № 4. – С. 531-537.
2. Агарков А.А. Каталитические свойства глутатионредуктазы из печени крыс в норме и при токсическом гепатите / А.А. Агарков, Т.Н. Попова, А.И. Семенихина // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55, № 2. – С. 169-176.
3. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / И.И. Дедов [и др.] // Сахарный диабет. – 2017. – Т. 20. – С. 109-112.
4. Антиоксидантная система, онтогенез и старение / С.К. Воскресенский [и др.] // Вопр. мед. химии. – 2004. – № 1. – С. 14-27.
5. Афанасьев В.Г. К микрометоду определения лимонной кислоты в сыворотке крови с помощью фотоэлектроколориметра / В.Г. Афанасьев, В.С. Зайцев, Т.И. Вольфсон // Лаб. дело. – 1973. – № 4. – С. 115-116.
6. Балаболкин М.И. Инсулинорезистентность и ее значение в патогенезе нарушений углеводного обмена и сахарного диабета типа 2 / М.И. Балаболкин // Сахарный диабет. – 2002. – № 1 – С. 12-20.
7. Балаболкин М.И. Роль гликирования белков, окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений при сахарном диабете / М.И. Балаболкин // Сахарный диабет. – 2002. – № 4 – С. 8-16.
8. Балаболкин М.И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений диабета / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова // Проблемы эндокринологии. – 2000. – № 6. – С. 29-34.
9. Балаболкин М.И. Современная тактика лечения сахарного диабета типа 2 / М.И. Балаболкин, В.М. Креминская, Е.М. Клебанова // Consilium Medicum. – 2001. – Т. 3, № 11. – С. 535-541.
10. Барабой В.А. Биологические функции, метаболизм и механизмы действия селена / В.А. Барабой // Успехи соврем. биол. – 2004. – Т. 124, № 2. – С. 157-168.
11. Барабой В.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии / В.А. Барабой, Д.А. Сутковой. – М.: Наука, 1984. – 160 с.
12. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения / И.В. Березовская // Хим.-фарм. журнал. – 2003. – Т. 37, № 3. – С. 32-34.

13. Богомолов А.Ф. Методические рекомендации по курсу экспериментальной физиологии для студентов биологического отделения биолого-химического факультета / А.Ф. Богомолов, И.Ю. Лукьянов, Л.Р. Горбачева. – Иваново: Ивановский государственный университет, 2005. – 43 с.
14. Божанская В.В. Осложнения инсулиннезависимого сахарного диабета / В.В. Божанская, Л.Г. Старикова // Вестник новых медицинских технологий. – 1999. – № 2. – С. 68-74.
15. Бузлама В.С. Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма у животных / В.С. Бузлама. – Воронеж.: РАСХН, 1997. – 35 с.
16. Владимиров Ю.А. Биологические мембраны и незапрограммированная смерть клетки / Ю. А. Владимиров // Соровский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 9. – С. 2-9.
17. Владимиров Ю.А. Свободнорадикальное окисление липидов и физические свойства липидного слоя биологических мембран / Ю.А. Владимиров // Биофизика. – 1987. – Т. 32, № 5. – С. 830-844.
18. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю.А. Владимиров // Вестник РАМН. – 1998. – № 7. – С. 43-51.
19. Воскресенский О.Н. Биоантиоксиданты – облигатные факторы питания / О.Н. Воскресенский, М.С. Бобырев // Вопр. мед. химии. – 1992. – Т. 38, № 4. – С. 21-26.
20. Вторичные мессенджеры цАМФ, Ca²⁺, NO — модулируют функциональные свойства лимфоцитов в условиях УФ-облучения / В.Г. Артюхов [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2010. – № 12. – С. 637-641.
21. Губский Ю.И. Токсические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях / Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев, С.В. Павлов // Современные проблемы токсикол. – 2005. – № 3. – С. 20-26.
22. Дедов И.И. Генетические аспекты сахарного диабета / И.И. Дедов, М.И. Балаболкин // Сахарный диабет. – 2000. – № 1. – С. 2-9.
23. Древаль А.В. Сахарный диабет. Фармакологический справочник. Стандарты диагностики и лечения / А.В. Древаль. – М.: ЭКСМО, 2012. – 544 с.
24. Дубинина Е.Е. Биологическая роль супероксидного анионрадикала и супероксиддисмутазы в тканях организма / Е.Е. Дубинина // Успехи современной биологии. – 1989. – Т. 108, № 1. – С.3-12.

25. Евстигнеева Р.П. Витамин Е как универсальный антиоксидант и стабилизатор биологических мембран / Р.П. Евстигнеева, И.М. Волкова, В.В. Чудинова // Биол. мембраны. – 1998. – Т. 15, № 2. – С. 119-137.
26. Зайцев В.Г. Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антиоксидантов прямого действия / В.Г. Зайцев, О.В. Островский, В.И. Закревский // Эксперим. клин. фармакол. – 2003. – Т. 66. – №4. – С. 66-70.
27. Занозина О.В. Свободно-радикальное окисление при сахарном диабете 2-го типа: источники образования, составляющие, патогенетические механизмы токсичности / О.В. Занозина, Н.Н. Боровков, Т.Г. Щербатюк // Современные технологии в медицине. – 2010. – №. 3. – С. 104-112.
28. Искусных И.Ю. Интенсивность свободнорадикальных процессов и экспрессия глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы в сердце крыс при адреналиновом миокардите / И.Ю. Искусных, Т.Н. Попова, О.С. Мушарова // Биомедицинская химия. – 2012. – Т. 58, № 5. – С. 530-538.
29. Кахновер Н.Б. Основные функции, локализация и распространение глутатионтрансфераз / Н.Б. Кахновер, Ю.И. Хмелевский // Укр. биох. журнал. – 1983. – Т. 55, № 1. – С. 86.
30. Коденцова В.М. Витамины и окислительный стресс // В.М. Коденцова, О.А. Вржесинская, В.К. Мазо // Вопросы питания. – 2013. – Т. 82, № 3. – С. 11-18.
31. Кожевников Ю.Н. О перекисном окислении липидов в норме и патологии / Ю.Н. Кожевников // Вопр. мед. хим. – 1985. – № 5. – С. 2-7.
32. Кондратьева Л.В. Бигуаниды в лечении сахарного диабета 2 типа. Современный взгляд на проблему / Л.В. Кондратьева // Регулярные выпуски РМЖ. – 2005. – № 6. – С. 305.
33. Косолапов В.А. Окислительный стресс в патогенезе сахарного диабета и его осложнений / В.А. Косолапов, М.П. Самохина // Информ. бюл. – 2006. – № 1. – С. 8.
34. Кудряшов Б.А. Значение эндогенного гепарина в защите организма от действия факторов риска, вызывающих экспериментальный диабет / Б.А. Кудряшов, А.М. Ульянов, Ю.А. Тарасов // Вопр. мед. химии. – 1989. – № 6. – С. 80-82.
35. Кулинский В.И. Активные формы кислорода и оксидативная модификация макромолекул: польза, вред и защита / В.И. Кулинский // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – Т. 38, № 1. – С. 27-32.
36. Кулинский В.И. Биологическая роль глутатиона / В.И. Кулинский, Л.С. Колесниченко // Успехи современной биологии. – 1990. – № 114. – С. 20-33.

37. Кухтина Е.Н. Влияние железа, цинка, меди на процессы перекисного окисления липидов / Е.Н. Кухтина, Н.Н. Глущенко // Биохимия. – 1996. – Т. 61, № 6. – С. 993-997.
38. Ленинджер А. Основы биохимии: в 3-х т. Т. 2. / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985. – 368 с.
39. Ллойд Э. Справочник по прикладной статистике / Э. Ллойд, У. Ледерман. – М.: Финансы и статистика, 1990. – 525 с.
40. Лысенко Н.Н. Основы экотоксикологии: учебное пособие / Н.Н. Лысенко, М.А. Догадина. – Орёл: Изд-во Орёл ГАУ, 2015. – 460 с.
41. Майоров А.Ю. Диагностика сахарного диабета и других категорий гипергликемии / А.Ю. Майоров // Справочник поликлинического врача. – 2013. – №2. – С. 57-61.
42. Матасова Л.В. Аконитатгидратаза млекопитающих в условиях оксидативного стресса / Л.В. Матасова, Т.Н. Попова // Биохимия. – 2008. – Т. 73, № 9. – С. 957-964.
43. Матюшин Б.Н. Определение супероксиддисмутазной активности в материале пункционной биопсии печени при ее хроническом поражении / Б.Н. Матюшин, А.С. Логинов, В.Д. Ткачев // Лаб. дело. – 1991. – № 7. – С. 16-19.
44. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – М.: Новая волна, 2012. – 1216 с.
45. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
46. Михайлов В.Ф. Сигнальная функция активных форм кислорода в регуляторных сетях ответа клеток на повреждающие воздействия: участие в реализации радиочувствительности и нестабильности генома / В.Ф. Михайлов, В.К. Мазурик, Е.Б. Бурлакова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2003. – Т. 43, № 1. – С. 5-18.
47. Мычка В.Б. Сердечно-сосудистые осложнения сахарного диабета типа 2 / В.Б. Мычка, И.Е. Чазова // Consilium medicum. – 2003. – Т. 5, № 9. – С.100-107.
48. Нелаева А.А. Состояние перекисного окисления липидов в мембранах тромбоцитов у больных ИЗСД при кетоацидозе и коррекция витаминами-антиоксидантами / А.А. Нелаева, И.А. Трошина // Сахарный диабет. – 1999. – В. 3, №4. – С. 55.
49. Николайчик Е.А. Регуляция метаболизма клетки / Е.А. Николайчик. – Минск: БГУ, 2007. – 165 с.
50. Окислительная модификация белков сыворотки крови, метод ее определения / Е.Е. Дубинина [и др.] // Вопр. мед. химии. – 1995. – Т. 41, № 1. – С. 24-26.

51. Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования / Л.Е. Муравлева [и др.] // *Фундаментальные исследования*. 2010. – № 1. – С. 74-78.
52. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньшикова [и др.] – М: Слово, 2006. – 553 с.
53. Осипов А.Н. Активные формы кислорода и их роль в организме / А.Н. Осипов, О.А. Азизова, Ю.А. Владимиров // *Успехи биологической химии*. – 1990. – Т. 31, № 2. – С. 180-208.
54. Оценка степени фрагментации ДНК, активности аконитатгидратазы и уровня цитрата при сахарном диабете 2 типа у крыс и введении мелатонина / Агарков А.А. [и др.] // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. – 2012. – № 3. – С. 21-26.
55. *Патологическая физиология* / Под ред. А.Д. Адо и Л.М. Ишимовой. – М.: Медицина, 1980. – 520 с.
56. Пентюк А.А. Активности глутатионзависимых ферментов, каталазы и СОД в печени и сердце крыс с дефицитом витамина А / А.А. Пентюк, О.А. Яковлева, Г.Г. Коновалова // *Биохимия*. – 1987. – №6. – С. 1009.
57. Пероксидное окисление липидов и стресс / В.А. Барабой [и др.]. – СПб.: Наука. – 1992. – 148 с.
58. Петрович Ю.А. Свободнорадикальное окисление и его роль в патогенезе воспаления, ишемии и стресса / Ю.А. Петрович, Д.В. Гуткин // *Пат. физиол. и эксп. терапия*. – 1986. – № 5. – С. 85-92.
59. Поберезкина Н.Б. Биологическая роль супероксиддисмутазы / Н.Б. Поберезкина, Л.Ф. Лосинская // *Укр. био-хим. журн.* – 1989. – Т. 61, № 2. – С. 14-27.
60. Пожилова Е.В. Активные формы кислорода в физиологии и патологии клетки / Е.В. Пожилова, В.Е. Новиков, О.С. Левченкова // *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 13-19.
61. Резистентность к гипогликемическому действию инсулина, вызванная протамин-сульфатом / Б.А. Кудряшов [и др.]. // *Пробл. эндокринологии*. – 1986. – № 1. – С. 51-56.
62. Роль гепарина в осуществлении гипогликемического действия инсулина / Б.А. Кудряшов [и др.]. // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* – 1984. – № 5. – С. 516-518.
63. Роль фенольных антиоксидантов в повышении устойчивости органических систем к свободно-радикальному окислению: Аналитический обзор / И.В. Сорокина [и др.]. – Новосибирск: СО РАН ГПНТБ, Новосиб. ин-т орган. химии, 1997. – 68 с.

64. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
65. Сахарный диабет и хроническая болезнь почек: достижения, нерешенные проблемы и перспективы лечения / М.В. Шестакова [и др.] // Сахарный диабет. – 2011. – № 1. – С. 81-88.
66. Свободно-радикальное окисление и антиоксидантная терапия / В.К. Казимирко [и др.]. – К.: Морион, 2004. – 160с.
67. Свободнорадикальное окисление липидов и белков – универсальный процесс жизнедеятельности организма / М.А. Луцкий [и др.] // Advances In Current Natural Sciences. – 2014. – №12. – С. 24-28.
68. Северин Е.С. Биохимия / Е.С. Северин. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004. – 779 с. (174)
69. Система антиоксидантной защиты организма и старение / А.А. Подколзин [и др.] // Профилактика старения. – 2000. – № 3. – С.46-52.
70. Скиба А.В. Метаболические изменения в динамике развития экспериментального сахарного диабета 2 типа у крыс / А.В. Скиба // Вестник стоматологии. – 2012. – № 4. – С. 22-25.
71. Смирнова О.М. Место метформина в современном лечении и профилактике сахарного диабета 2 типа / О.М. Смирнова // Сахарный диабет. – 2010. – № 3. – С. 45-46.
72. Смирнов Л.Д. Антиоксиданты в медицине: новые возможности / Л.Д. Смирнов // Наука и жизнь. – 2002. – № 12. – С. 36-38.
73. Соколовский В.В. Тиоловые антиоксиданты в молекулярных механизмах неспецифической реакции организма на экстремальные воздействия / В.В. Соколовский // Вопр. мед. химии. – 1988. – Т. 34, № 6. – С. 2-11.
74. Состояние активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ в клетках здоровой и опухолевой ткани у больных раком легкого в зависимости от полиморфизма гена GSTM1 / А.А. Савченко [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 3. – С. 24-27.
75. Спиричев В.Б. Витамины, витаминоподобные и минеральные вещества / В.Б. Спиричев. – М: МЦФЭР, 2004. – 239 с.
76. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1972. – С. 63-64.
77. Старостина Е.Г. Бигуаниды в лечении сахарного диабета 2 типа // Е.Г. Старостина, А.В. Древаль. – М.: Медпрактика, 2000. – 104 с.

78. Телетаева Г.М. Цитокины и противоопухолевый иммунитет / Г.М. Телетаева // *Практ. онкол.* – 2007. – Т. 8, № 4. – С. 211-218.
79. Турков М.И. Супероксиддисмутаза: свойства и функции / М.И. Турков // *Успехи соврем. биологии.* – 1976. – Т. 81, № 3. – С. 341 – 354.
80. Турпаев К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов / К.Т. Турпаев // *Биохимия.* – 2002. – № 61. – С. 339-352.
81. Ульянов А.М. Инсулярная система животных при хроническом дефиците гепарина / А.М. Ульянов, Ю.А. Тарасов // *Вопр. мед. химии.* – Т. 46, № 2. – 2000. – С. 149-154.
82. Чернышева Е.Н. Влияние комплексного лечения с использованием метформина на содержание белка р53 у пациентов с сахарным диабетом 2 типа при метаболическом синдроме / Е.Н. Чернышева, Т.Н. Панова // *Кубанский научный медицинский вестник.* – 2015. – № 6. – С. 122-127.
83. Чеснокова Н.П. Источники образования свободных радикалов и их значение в биологических системах в условиях нормы / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // *Современные наукоемкие технологии.* – 2006. – № 6. – С. 28-32.
84. Чеснокова Н.П. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // *Успехи современного естествознания.* – 2006. – № 7. – С. 29-34.
85. Шичкин В.П. Патогенетическое значение цитокинов и перспективы цитокиновой /антицитокиновой терапии// *Иммунология.* – 1998. – № 2. – С. 9-13.
86. Activation of the AMP-Activated Kinase by Antidiabetes Drug Metformin Stimulates Nitric Oxide Synthesis In Vivo by Promoting the Association of Heat Shock Protein 90 and Endothelial Nitric Oxide Synthase / J. D. Bradley [et al.] // *Diabetes.* – 2005. – № 55. – P. 496-505.
87. (5-Arylfuran-2-ylcarbonyl)guanidines as Cardioprotectives through the Inhibition of Na⁺/H⁺ Exchanger Isoform-1 / S. Lee [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2005. – V. 48, № 8. – P. 2882-2891.
88. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat / M.J. Reed [et al.] // *Metabolism.* – 2000. – V. 49, № 11. – P. 1390-1394.
89. Advances in iron metabolism: a transition state / E. Cadet [et al.] // *Rev. Med. Interne.* – 2005. – V. 26. – P. 315-324.
90. Aebi H. Catalase in vitro / H. Aebi // *Methods in Enzymology.* – 1984. – V. 105. – P. 121-126.
91. Androgen-dependent messenger RNA(s) related to secretory proteins in the mouse epididymis / N.B. Ghyselinck [et al.] // *J. Reprod. Fertil.* – 1989. – V. 85. – P. 631-639.

92. Antihyperglycemic mechanism of metformin occurs via the AMPK/LXR α /POMC pathway / K. Cho [et al.] // *Sci. Rep.* – 2015. – V. 5. – P. 1-7.
93. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis / R. Sharma [et al.] // *Antioxid. Redox. Signal.* – V. 6. – P. 289-300.
94. Ashokkumar N. Effect of N-benzoyl-D-phenylalanine and metformin on carbohydrate metabolic enzymes in neonatal streptozotocin diabetic rats // N. Ashokkumar, L. Pari // *Clin. Chim. Acta.* – 2004. V. 351, № 1-2. – P. 105-113.
95. Association of Metformin's effect to increase insulin-stimulated glucose transport with potentiation of insulin-induced translocation of glucose transporters from intracellular pool to plasma membrane in rat adipocytes / S. Matthaie [et al.] // *Diabetes.* – 1999. – V. 40, № 7. – P. 850-857.
96. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP / R.A. Miller [et al.] // *Nature.* – 2013. – V. 494. – P. 256-260.
97. Catalytic cycle of human glutathione reductase near 1 Å resolution / D.S. Berkholtz [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2008. – V. 382, № 2. – P. 371-384.
98. Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes / S.V. McLennan [et al.] // *Diabetes.* – 1991. – V. 40. – P. 344-348.
99. Chappellini M.D. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency / M.D. Chappellini, G. Fiorelli // *The Lancet.* – 2008. – V. 371. – P. 64-74.
100. Characterization of mammalian selenoproteomes / G.V. Kryukov [et al.] // *Science.* – 2003. – V. 300. – P. 1439-1443.
101. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening / K. Srinivasan [et al.] // *Pharmacological Research.* – 2005. – V. 52, № 4. – P. 313-320.
102. Comparison of the effects of pioglitazone and metformin on hepatic and extra-hepatic insulin action in people with type 2 diabetes / R. Basu [et al.] // *Diabetes.* – 2008. – V. 57, № 1. – P. 24-31.
103. C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus / A.D. Pradhan [et al.] // *JAMA.* – 2001. – V. 286, № 3. – P. 327-324.
104. Cusi K. Metformin: a review of its metabolic effects / K. Cusi, R.A. DeFronzo // *Diabetes Rev.* – 1998. – V. 6. – P. 89-131.
105. Davidson M.B. An overview of metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus / M.B. Davidson, A.L. Peters // *Am. J. Med.* – 1997. – V. 102. – P. 99-110.

106. Davies K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids / K.J. Davies, M.E. Delsignore, S.W. Lin // *J. Biol. Chem.* – 1987. – V. 262, № 20. – P. 9908-9913.
107. Dear T.N. Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins / T.N. Dear, K. Campbell, T.H. Rabbitts // *Biochemistry.* – 1991. – V. 30, № 43. – P. 10376-10382.
108. Deneke S. Regulation of cellular glutathione / S. Deneke, B. Fanburg // *Amer. J. physiol.* – 1989. – V. 257, № 4. – P. 163-173.
109. Diabetes mellitus and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: from one crisis to another / C. Carette [et al.] // *Diabetes Metab.* – 2011. – V. 37, № 1. – P. 79-82.
110. Diabetic Retinopathy and Serum Lipoprotein Subclasses in the DCCT/EDIC Cohort / T.J. Lyons [et al.] // *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* – 2004. – V. 45. – P. 910-918.
111. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus / American Diabetes Association // *Diabetes Care.* – 2014. – V. 37. – P. 81-90.
112. Diet-induced central obesity and insulin resistance in rabbits / S. Zhao [et al.] // *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* – 2008. – V. 92, № 1. – P. 105-111.
113. Distinct promoters determine alternative transcription of GPx-4 into phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase variants / M. Maiorino [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 34286-34290.
114. Diversity of glutathione peroxidases / F. Ursini [et al.] // *Methods Enzymol.* – 1995. – V. 252. – P. 38-53.
115. Dym O. Sequence-structure analysis of FAD-containing proteins / O. Dym, D. Eisenberg // *Protein Sci.* – 2001. – V. 10, № 9. – P. 1712-1728.
116. Effects of weight change and metformin on fibrolysis and the von Willebrand factor in obese nondiabetic subjects. The BIGPRO1 Study / M.A. Charles [et al.] // *Diabetes Care.* – 1998. – № 2. – P. 67-75.
117. Epp O. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution / O. Epp, R. Ladenstein, A. Wendel // *Eur. J. Biochem.* – 1983. – V. 133, №1. – P. 51-69.
118. Ferrannini E. Diabetes and hypertension: the bad companions / E. Ferrannini, W.C. Cushman // *The Lancet.* – 2012. – V. 380. – P. 601-610.
119. Flohe L. Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects. / L. Flohe, D. Dolphin // *J. Wiley and Sons.* – 1989. – V. 3. – P. 643-647.

120. Flohe L. The selenoprotein glutathione peroxidase / L. Flohe // *Glutathione: chemical, biochemical and medical aspects*. – 1989. – V. 3. – P. 643-731.
121. Fluery C. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling / C. Fluery, B. Mignotte, J.L. Vayssiere // *Biochimie*. – 2002. – V. 84, № 2-3. – P. 131-141.
122. Free radical damage to proteins: The influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins / R.T. Dean [et al.] // *Free Rad. Biol. Med.* – 1991. – V. 11, № 12. – P. 161-165.
123. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko [et al.] // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2007. – V. 39, № 1. – P. 44-84.
124. Frei B. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma / B. Frei, R. Stocker, B.N. Ames // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1988. – V. 85. – P. 9748-9752.
125. Frova C.C. Glutathione transferases in the genomics era: new in sights and perspectives / C.C. Frova // *Biochem. Engineering*. – 2006. – V. 23, № 4. – P. 149-69.
126. Garabadu D. Diazepam potentiates the antidiabetic, antistress and anxiolytic activities of metformin in type-2 diabetes mellitus with cooccurring stress in experimental animals / D. Garabadu, S. Krishnamurthy // *Acta Biochim. Pol.* – 2013. – V.60, № 4. – P. 607-612.
127. Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase kappa and evidence for a peroxisomal localization / F. Morel [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279, № 16. – P. 16246-16253.
128. Giacco F. Oxidative Stress and Diabetic Complications / F. Giacco, M. Brownlee // *Circ. Res.* – 2010. – V. 107. – P. 1058-1070.
129. Glutathione antioxidant system in patients with Diabetes Mellitus / L. Kolesnichenko [et al.] // *J. Clin. Lipidol.* – 2008. – V. 2, № 5. – P. 124-125.
130. Glutathione metabolism and its implications for health / G. Wu [et al.] // *J. Nutr.* – 2004. – V. 134, № 3. – P. 489-492.
131. Glutathione reductase from human erythrocytes. The sequences of the NADPH domain and of the interface domain / R.L. Krauth-Siegel [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1982. – V. 121. – P. 259-267.
132. Glutathionylation regulates cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase activity / S.W. Shin [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2009. – V. 43, № 4. – P. 409-416.
133. Grand P.J. Beneficial effects of metformin on hemostasis and vascular function in man / P.J. Grand // *Diabetes Metab.* – 2003. – V. 29, № 6. – P. 45-52.
134. Halliwell B. Antioxidant in Human Health and Disease / B. Halliwell // *Annual Review of Nutrition*. – 1996. – V. 16. – P. 33-50.

135. Ham A.J. Antioxidant reactions of vitamin E in the perfused rat liver: product distribution and effect of dietary vitamin E supplementation / A.J. Ham, D.C. Liebler // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1997. – V. 339. – P. 157-164.
136. Hayes J.D. Glutathione transferases / J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2005. – V. 45. – P.51-88.
137. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and β -cell apoptosis / Z. Zhang [et al.] // *The FASEB J.* – 2010. – V. 24, № 5. – P. 1497-1505.
138. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein-kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells / T. Inoguchi [et al.] // *Diabetes.* – 2000. – V. 49. – P. 1939-1945.
139. High-fat diet impairs the effects of a single bout of endurance exercise on glucose transport and insulin sensitivity in rat skeletal muscle / S. Tanaka [et al.] // *Metabolism.* – 2007. – V. 56, № 12. – P. 1719-1728.
140. High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats / M. Zhang [et al.] // *The Journal of Nutritional Biochemistry.* – 2008. – V. 19, № 8. – P. 505-513.
141. Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury / J.R. Wispe [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1992. – V. 267. – P. 23937-23941.
142. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase(NPGPx) essential for all eviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells / A. Utomo [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 43522-43529.
143. Import into mitochondria of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase requires a leader sequence / M. Arai [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – V. 227, № 2. – P. 433-439.
144. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptive response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae* / S. Izawa [et al.] // *Biochem. J.* – 1998. – V. 330, № 2. – P. 811-817.
145. Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin / S.L. Bowker [et al.] // *Diabetes Care.* – 2006. – V. 29, № 2. – P. 254-258.
146. Induction of antioxidant gene expression in a mouse model of ischemic cardiomyopathy is dependent on reactive oxygen species / S. Sharma [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2006. – V. 40. – P. 2223-2231.

147. Jacob R.A. The integrated antioxidant system / R.A. Jacob // *Nutrition Research*. – 1995. – V. 15, № 5. – P. 755-766.
148. Jones D.P. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance / D.P. Jones // *Methods Enzymol.* – 2002. – V. 348. – P. 93-112.
149. Kirpichnikov D. Metformin: An Update / D. Kirpichnikov, S.I. McFarlane, J.R. Sowers // *Ann. Intern. Med.* – 2002. – № 137. – P. 25-33.
150. Kletzien R.F. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress / R.F. Kletzien, P.K. Harris, L.A. Foellmi // *The FASEB J.* – 1994. – V. 8, № 2. – P. 174-181.
151. Klip A. Cellular mechanism of action of metformin / A. Klip, L.A. Leiter // *Diabetes Care*. – 1990. – V. 13, № 6. – P. 696-704.
152. Lawrence R.A. Hepatic Cytosolic Non Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase Activity: Its Nature and the Effect of Selenium Deficiency / R.A. Lawrence, L.K. Parkhill, R.F. Burk // *The Journal of Nutrition*. – 1978. – V. 108, № 6. – P. 981-987.
153. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes / S. Lenzen // *Diabetologia*. – 2008. – V. 51, № 6. – P. 216-226.
154. Levine R.L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease // R.L. Levine // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – V. 32, № 9. – P. 790-796.
155. Livak K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method / K.J. Livak, T.D. Schmittgen // *Methods*. – 2001. – V. 25, № 4. – P. 402-408.
156. Mamputu J.C. Antiatherogenic properties of metformin: the experimental evidence / J.C. Mamputu, N.F. Wiernsperger, G.A. Renier // *Diabetes Metab.* – 2003. – V. 29, №6. – P. 71-76.
157. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus / B.K. Tiwari [et al.] // *J. Biomark.* – 2013. – V. 17. – P. 1-8.
158. Marklund S.L. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight / S.L. Marklund // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1982. – V. 79. – P. 7634-7638.
159. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. A consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes / D.M. Nathan [et al.] // *Diabetologia*. – 2009. – V. 52, № 1. – P. 17-30.
160. Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage / C. Szabó [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272, № 14. – P. 9030-9036.

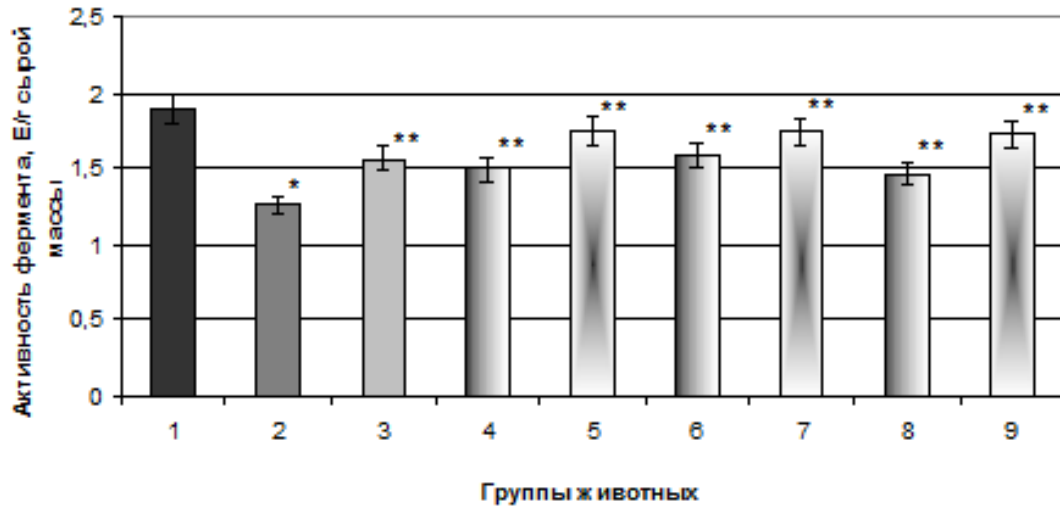
161. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus / M. Stumvoll [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1995. – V. 333, № 9. – P. 550-554.
162. Metabolic Syndrome and DNA Damage: The Interplay of Environmental and Lifestyle Factors in the Development of Metabolic Dysfunction / G.P. Stefani [et al.] // *Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases.* – 2015. – V. 5, № 7. – P. 65-76.
163. Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats / F.A. Duca [et al.] // *Nat. Med.* – 2015. – V. 21, № 5. – P. 506-511.
164. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients / J.M. Evans [et al.] // *BMJ.* – 2005. – V. 330, № 7503. – P. 1304-1305.
165. Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16 / G.W. Landman [et al.] // *Diabetes Care.* – 2010. – V. 33, № 2. – P. 322-326.
166. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells / N. Ouslimani [et al.] // *Metabolism.* – 2005. – V. 54, № 6. – P. 829-834.
167. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes / N. Musi [et al.] // *Diabetes.* – 2002. – V. 51, № 7. – P. 2074-2081.
168. Metformin monotherapy for type 2 diabetes mellitus / A. Saenz [et al.] // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2005. – V. 20, № 3. – P. 55-66.
169. Metformin reduces NAD(P)H oxidase activity in mouse cultured podocytes through purinergic dependent mechanism by increasing extracellular ATP concentration / A. Piwkowska [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2005. – V. 351, № 1-2. – P. 105-113.
170. Mills G.C. Hemoglobin catabolism, I: glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown / G.C. Mills // *J. Biol. Chem.* – 1957. – V. 229. – P. 189-197.
171. Mirvish S.S. Effects of vitamin C and E on N-nitroso compound formation, carcinogenesis, and cancer / S.S. Mirvish // *Cancer.* – 1986. – V. 58. – P. 1842-1850.
172. Mitochondrial metabolism and type-2 diabetes: a specific target of metformin / X.M. Leverve [et al.] // *Diabetes Metab.* – 2003. – V. 29, № 2. – P. 88-94.
173. Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells / N.M. Kamerbeek [et al.] // *Blood.* – 2007. – V. 109. – P. 3560-3566.
174. Molecular control of the cytosolic aconitase/IRP1 switch by extramitochondrial frataxin / I. Condo [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2010. – V. 19, № 7. – P. 1221-1229.
175. Muller K. Gp120 of HIV-1 induces apoptosis in rat cortical cell cultures: prevention by memantine / K. Muller // *Eur. J. Pharmacol.* – 1992. – V. 226, № 6. – P. 209-214.

176. Natali A. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review / A. Natali, E. Ferrannini // *Diabetologia*. – 2006. – V. 49, № 3. – P. 434-441.
177. Non-selenium-dependent glutathione peroxidase activity in rat lung: Association with lung glutathione S-transferase activity and the effects of hyperoxia / S.G. Jenkinson [et al.] // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 1983. – V. 68, № 3. – P. 399-404.
178. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes / R. Masella [et al.] // *Nutr. Biochem.* – 2005. – V. 16, № 10. – P. 577-586.
179. Owen M.R. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain / M.R. Owen, E. Doran, A.P. Halestrap // *Biochem. J.* – 2000. – V. 348, № 3. – P. 607-614.
180. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes / J.L. Evans [et al.] // *Endocrine Reviews*. – 2002. – V. 23, № 5. – P. 599-622.
181. Panzram G. Mortality and survival in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus / G. Panzram // *Diabetologia*. – 1987. – V. 30, № 3. – P. 123-131.
182. Papa S. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging / S. Papa, V.P. Skulachev // *Molec. Cell. Biochem.* – 1997. – V. 174. – P. 305-319.
183. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance / S. Matthaei // *Endocr. Rev.* – 2000. – V. 21, № 6. – P. 585-618.
184. Patra K.C. The pentose phosphate pathway and cancer / K.C. Patra, N. Hay // *Trends in Biochem. Sciences*. – 2014. – V. 39, № 8. – P. 347-354.
185. Peroxisomal beta-oxidation of polyunsaturated fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*: isocitrate dehydrogenase provides NADPH for reduction of double bonds at even positions / C.W. vanRoermund [et al.] // *The EMBO J.* – 1998. – V. 17, № 3. – P. 677-687.
186. Peroxisomal NADP-Dependent Isocitrate Dehydrogenase. Characterization and Activity Regulation during Natural Senescence / F.J. Corpas [et al.] // *Plant Physiol.* – 1999. – V. 121, № 3. – P. 921-928.
187. Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase: genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence / R. Brigelius-Flohé [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269, № 10. – P. 7342-7348.
188. Poroikov V.V. PASS: Prediction of Biological Activity Spectra for Substances / V.V. Poroikov, D.A. Filimonov // *Predictive Toxicology*; ed. By C. Helma. – N.Y.: Taylor & Francis, 2005. – P. 508.

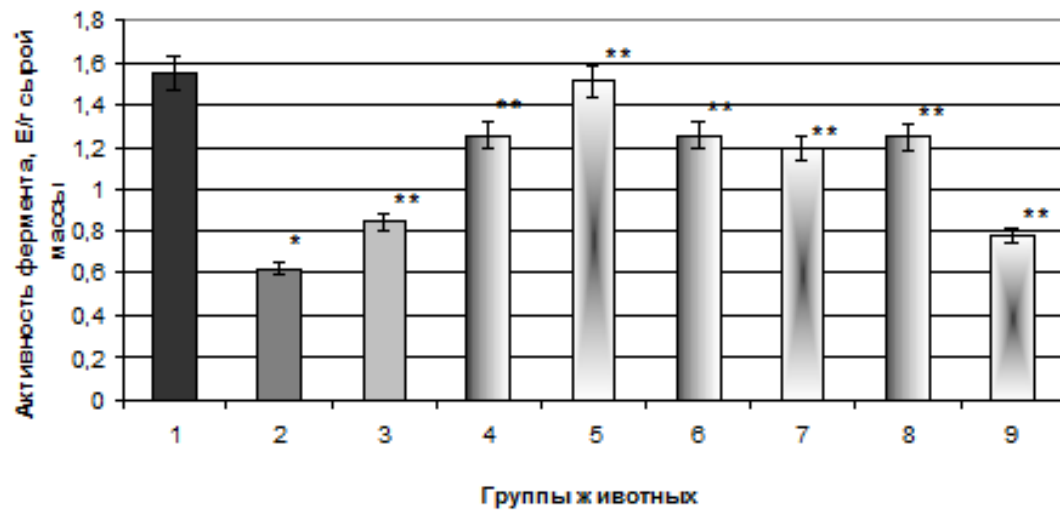
189. Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences / K. Takahashi [et al.] // *J. Biochem.* – 1990. – V. 108. – P. 145-148.
190. Primary structure of the nuclear forms of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in rat spermatozoa / M. Maiorino [et al.] // *FEBS Lett.* – 2005. – V. 579. – P. 667-670.
191. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress / I. Dalle-Donne [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2003. – V. 329, № 1-2. – P. 23-38.
192. Radencovich M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art / M. Radencovich, M. Stojanovich, M. Prostran // *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* – 2016. – V. 78. – P. 13-31.
193. Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells / F. Geissmann [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2003. – V. 198, № 4. – P. 623-634.
194. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis / S.R. Salpeter [et al.] // *Arch. Intern. Med.* – 2003. – V. 163, № 21. – P. 2594-2602.
195. Selenoprotein P protects endothelial cells from oxidative damage by stimulation of glutathione peroxidase expression and activity / H. Steinbrenner [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2006. – V. 40, № 9. – P. 936-943.
196. Sen C.K. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction / C.K. Sen // *Curr. Top. Cell Regul.* – 2000. – V. 36. – P. 1-30.
197. Serum selenoprotein P levels in patients with type 2 diabetes and prediabetes: implications for insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis / S.J. Yang [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2011. – V. 96, № 8. – P. 1325-1329.
198. Shelly C.L. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies / C.L. Shelly // *FASEB J.* – 1999. – № 13. – P. 1169-1183.
199. Sirtori C.R. Re-evaluation of a biguanide, metformin: mechanism of action and tolerability / C.R. Sirtori, C. Pasik // *Pharmacological Research.* – 1994. – V. 30, № 3. – P. 187-228.
200. Skulachev V.P. Mitochondria targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases // *J. of Alzheimers Dis.* – 2012. – V. 28, № 2. – P. 283-289.
201. Srinivasan K. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening / K. Srinivasan [et al.] // *Pharmacological Research.* – 2005. – V. 52, № 4. – P. 313-320.
202. Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase / G. Martini [et al.] // *The EMBO J.* – 1986. – V. 5, № 8. – P. 1849-1855.

203. Sun Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis / Y. Sun // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1990. – V. 8, № 6. – P. 583-599.
204. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas / T. Szkudelski // *Physiological Research*. – 2001. – V. 50, № 6. – P. 537-546.
205. Testosterone mediates expression of the selenoprotein PHGPx by induction of spermatogenesis and not by direct transcriptional gene activation / M. Maiorino [et al.] // *FASEB J*. – 1998. – V. 12. – P. 1359-1370.
206. The antioxidant role of vitamin C / A. Bendich [et al.] // *Advances in Free Radical Biology & Medicine*. – 1986. – V. 2, № 2. – P. 419-444.
207. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model / M. Zhang [et al.] // *Exp. Diabetes Res*. – 2009. – V. 2008. – P. 1-9.
208. The effect of aspartate on citrate metabolism in the cytosolic fraction of brain under conditions of normoxia, hypoxia and anesthesia / U. Rafalowska [et al.] // *J. Neurochem*. – 1975. – V. 25, № 4. – P.497-501.
209. The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase / D.J. Barra [et al.] // *Biol. Chem*. – 1984. – V. 259, № 20. – P. 12595-12601.
210. Type 2 Diabetes and Congenital Hyperinsulinism Cause DNA Double-Strand Breaks and p53 Activity in Beta Cells / S. Tornovsky-Babeay [et al.] // *Cell Metabolism*. – 2014. – V. 19, № 1. – P. 109-121.
211. Ursini F. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase / F. Ursini, M. Maiorino, C. Gregolin // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1985. – V. 839. – P. 62-70.
212. Weisiger R.A. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization / R.A. Weisiger, I. Fridovich // *J. Biol. Chem*. – 1973. – V. 248. – P. 4793-4796.
213. Wolf D. Free radicals in the physiological control of cell function / D. Wolf // *Physiol. Rev*. – 2002. – V. 82. – P. 47-95.

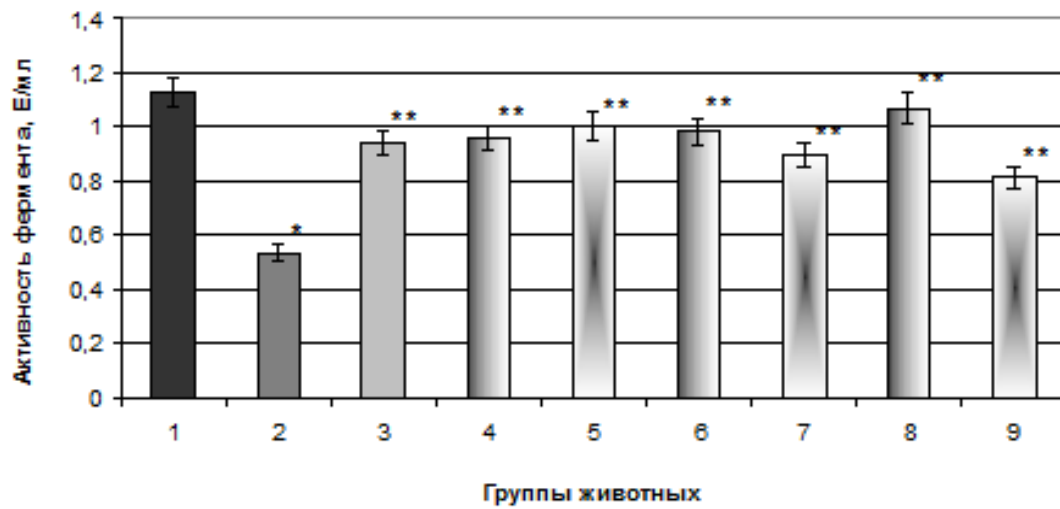
ПРИЛОЖЕНИЕ



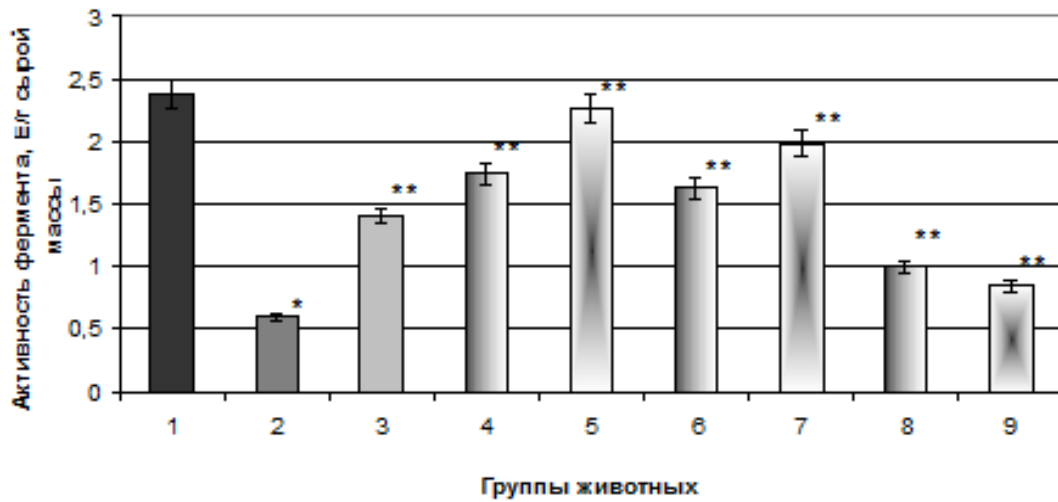
А



Б



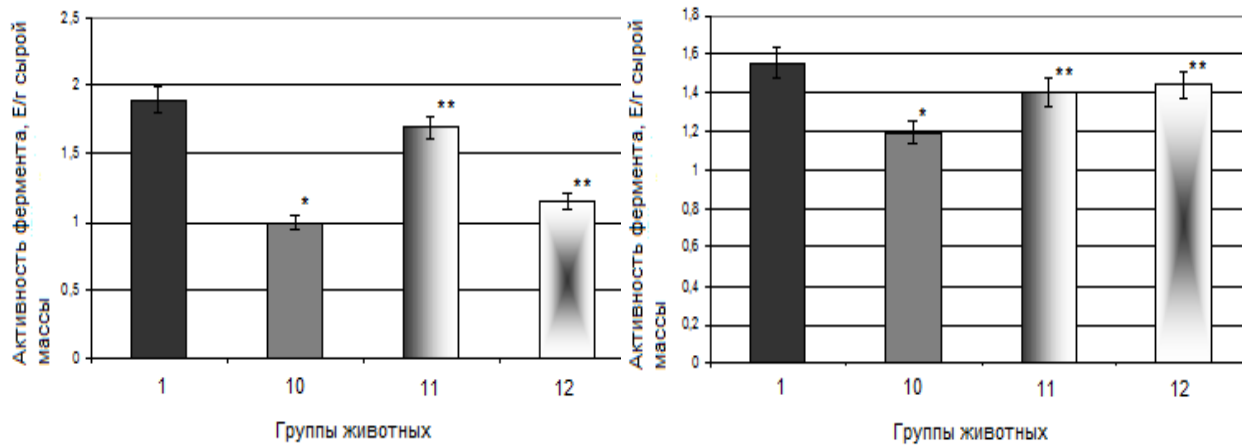
В



Г

Рис. 1. Активность аспартатаминотрансферазы, выраженная в Е/г сырой массы в печени (А), почках (Б), сердце (Г) и в Е/мл в сыворотке крови (В) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



А

Б

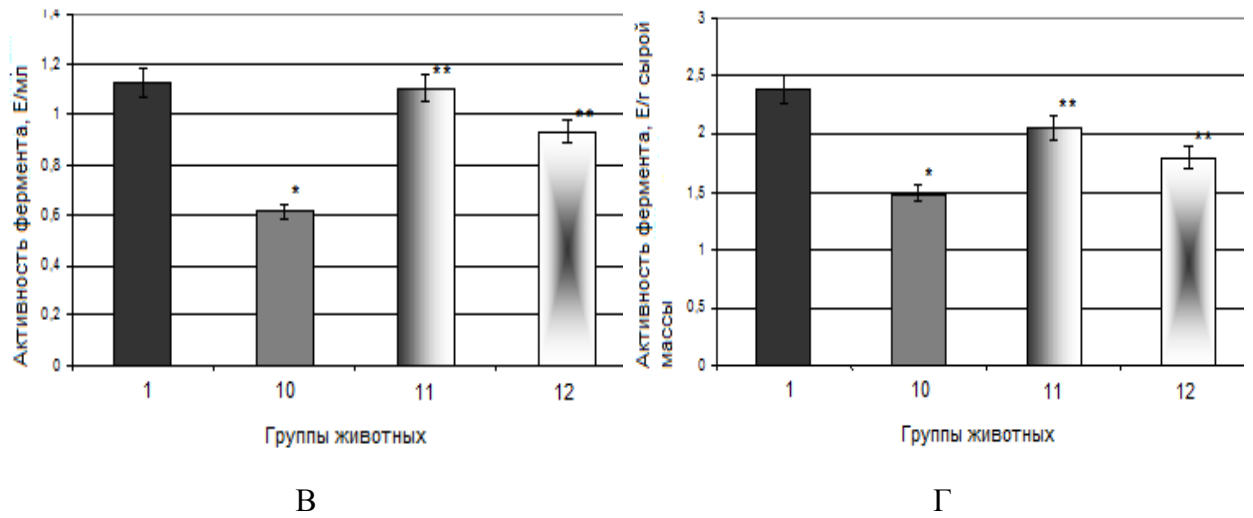
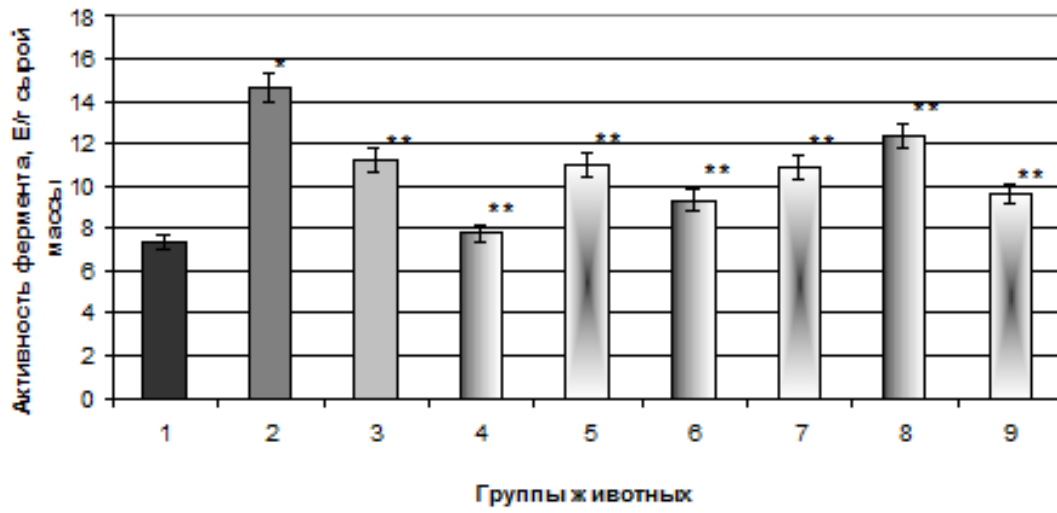
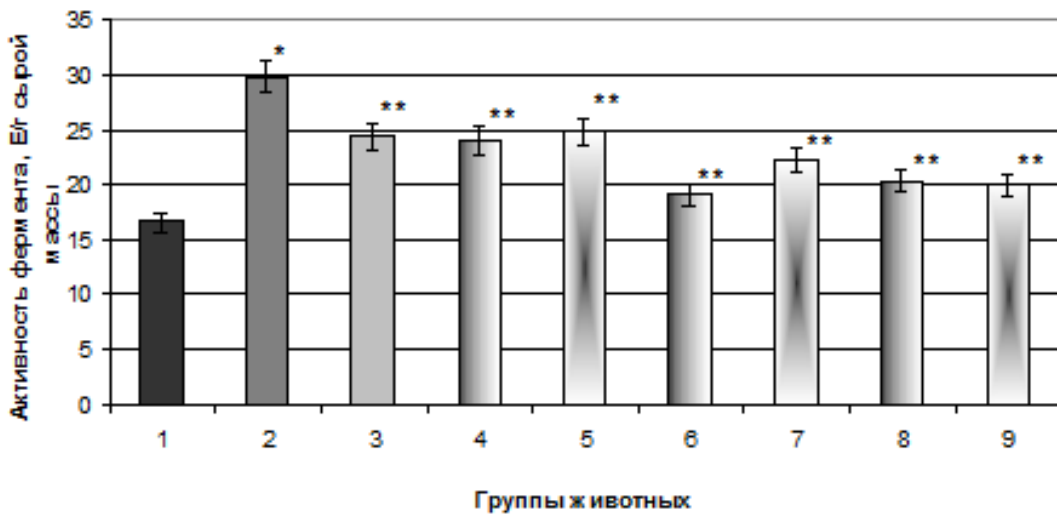


Рис. 2. Активность аконитатгидратазы, выраженная в Е/г сырой массы в печени (А), почках (Б), сердце (Г) и в Е/мл в сыворотке крови (В) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

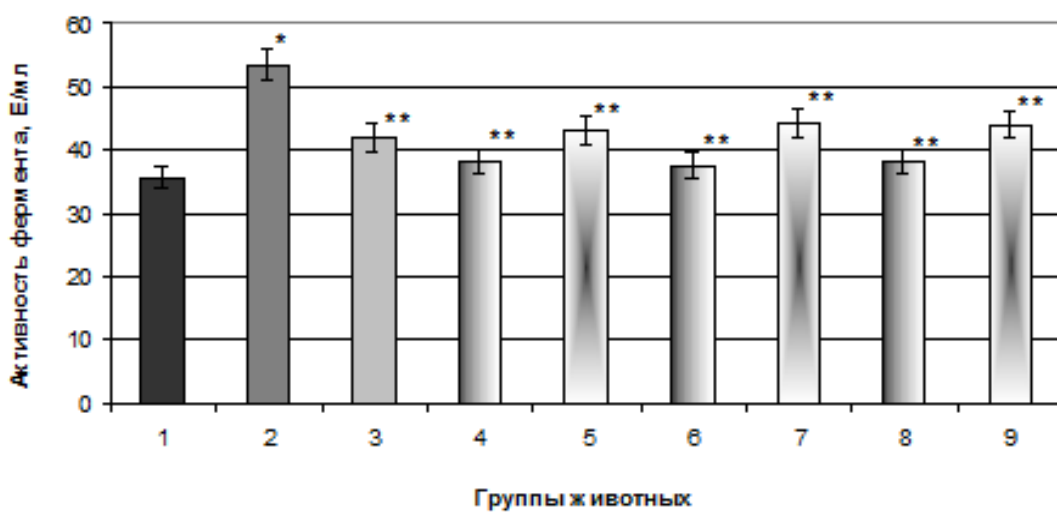
Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



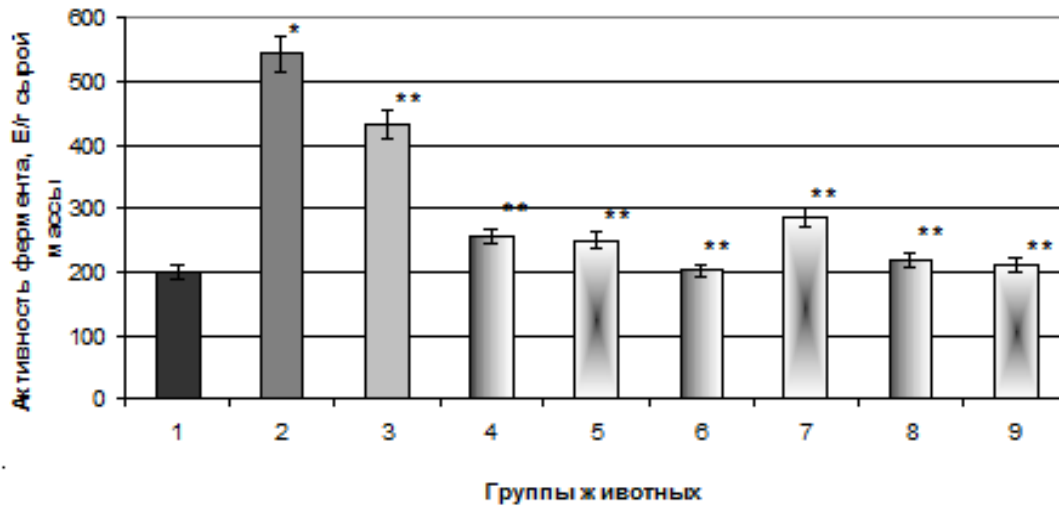
А



Б



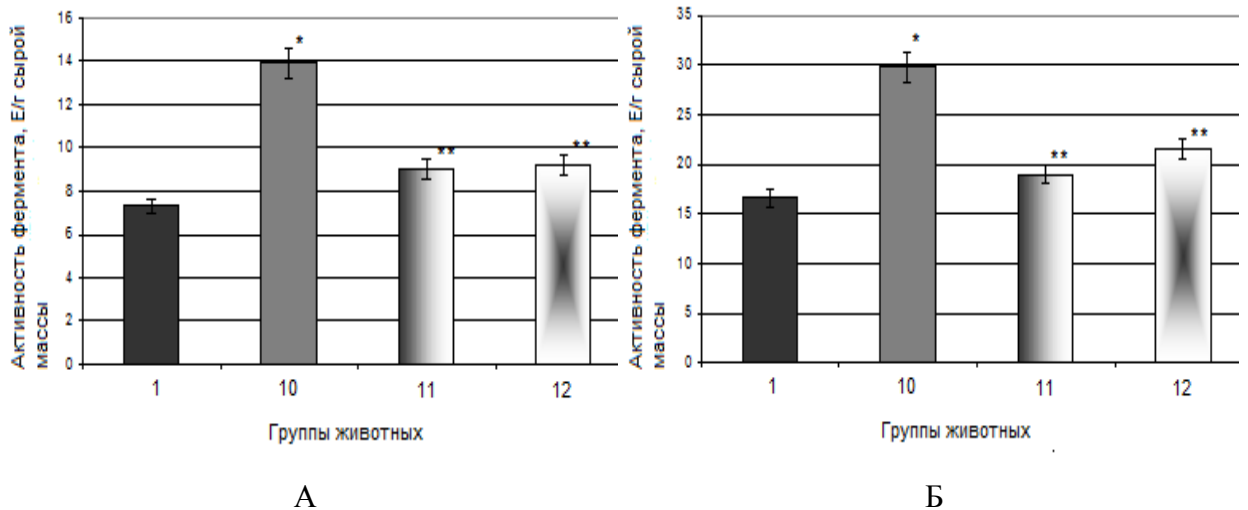
В



Г

Рис. 3. Активность супероксиддисмутазы, выраженная в Е/г сырой массы в печени (А), почках (Б), сердце (Г) и в Е/мл в сыворотке крови (В) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамина-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



А

Б

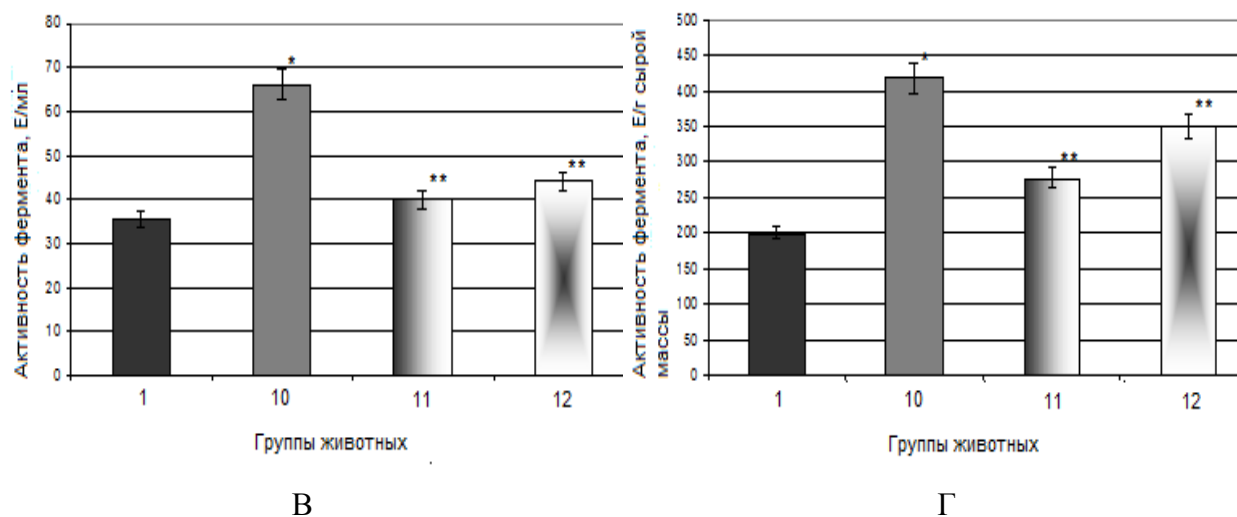
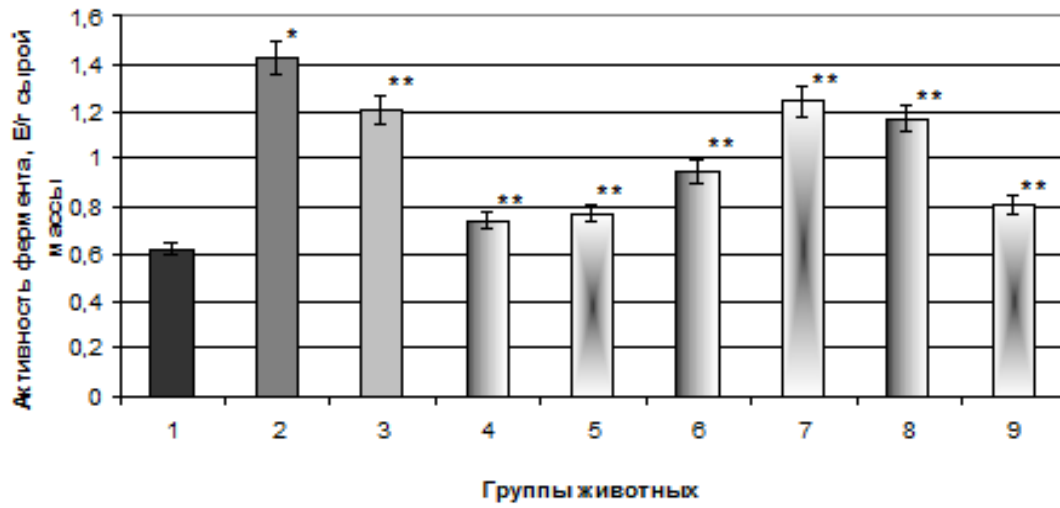
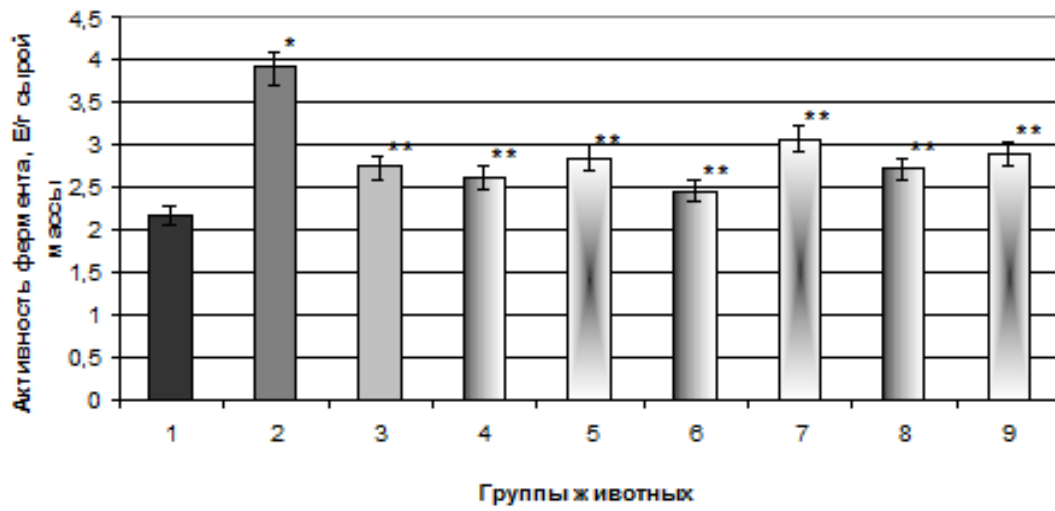


Рис. 4. Активность супероксиддисмутазы, выраженная в Е/г сырой массы в печени (А), почках (Б), сердце (Г) и в Е/мл в сыворотке крови (В) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

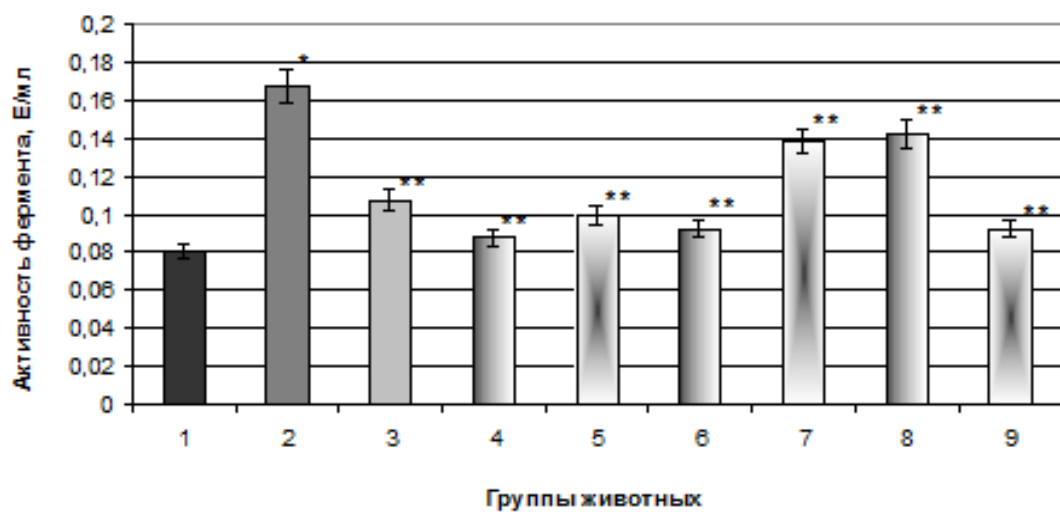
Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



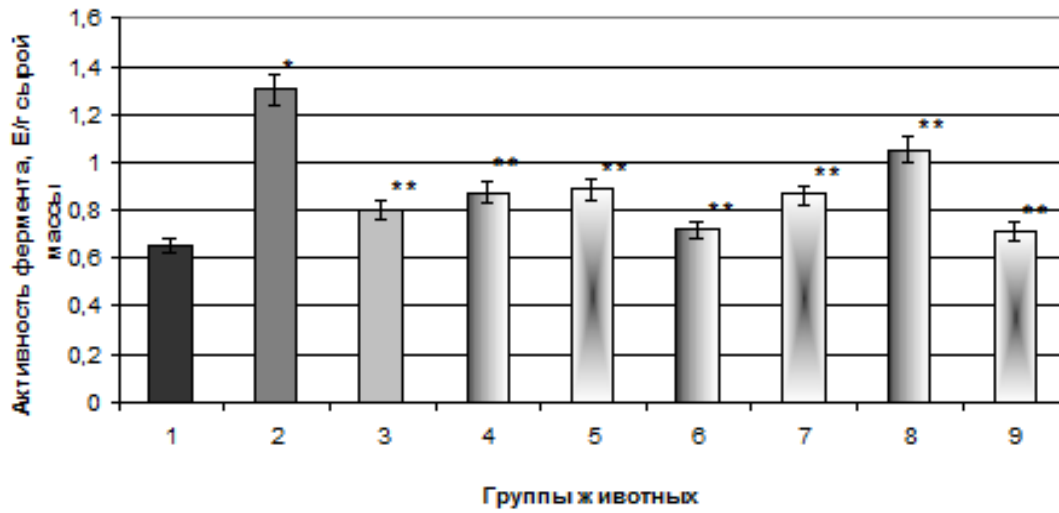
А



Б

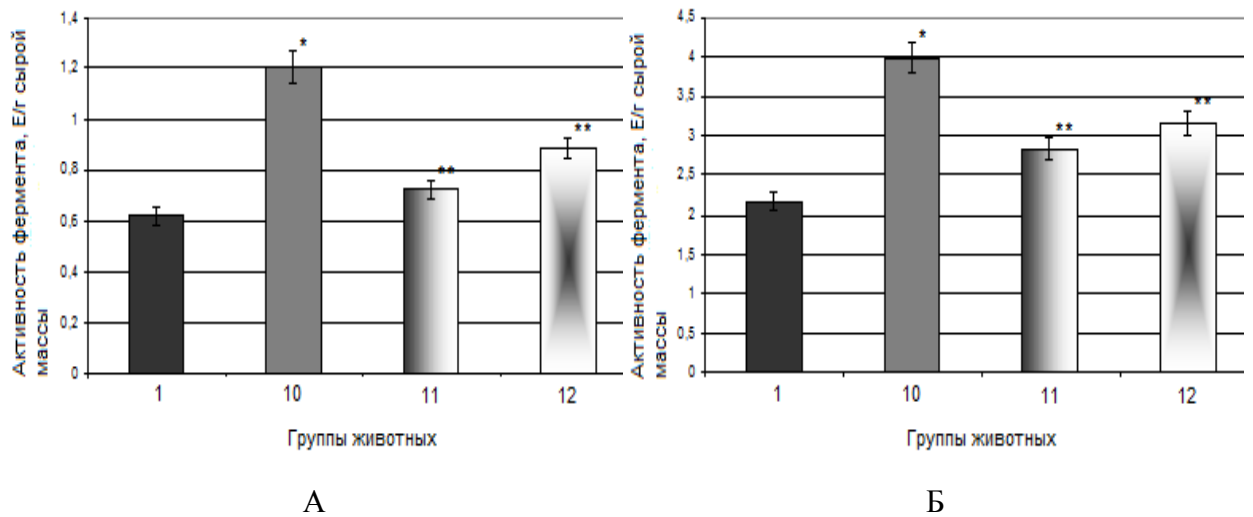


В



Г

Рис. 5. Активность каталазы, выраженная в Е/г сырой массы в печени (А), почках (Б), сердце (Г) и в Е/мл в сыворотке крови (В) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)
 Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



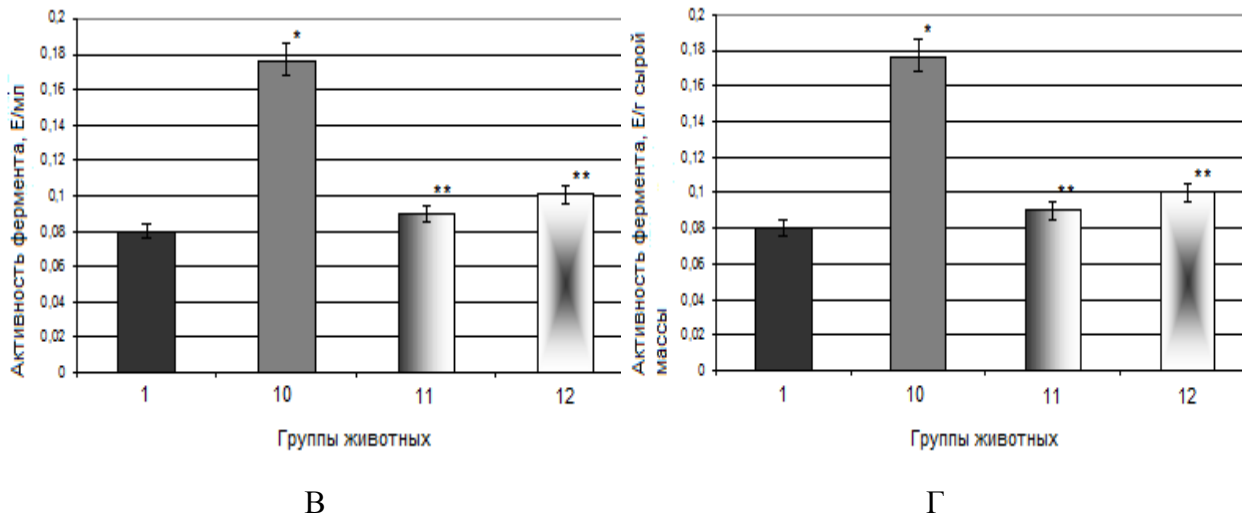
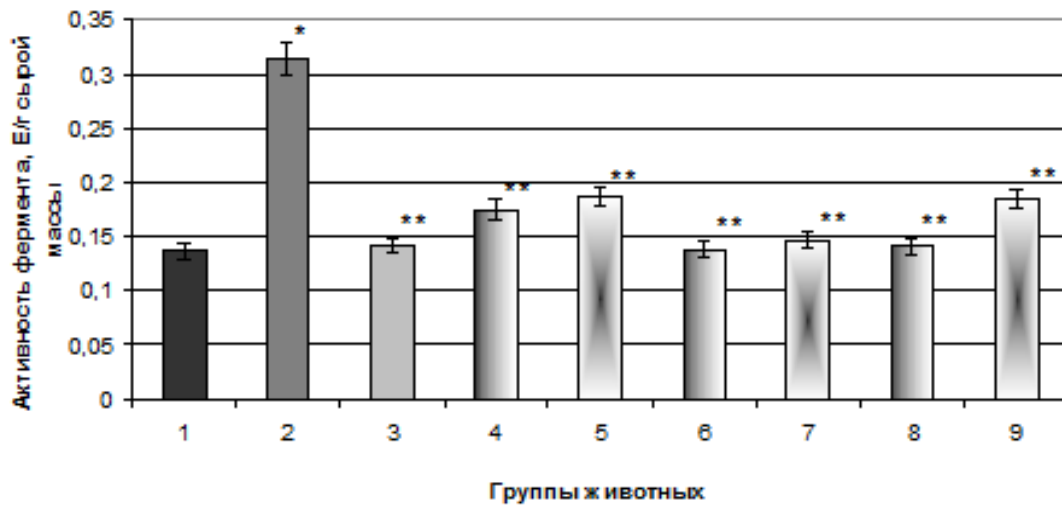
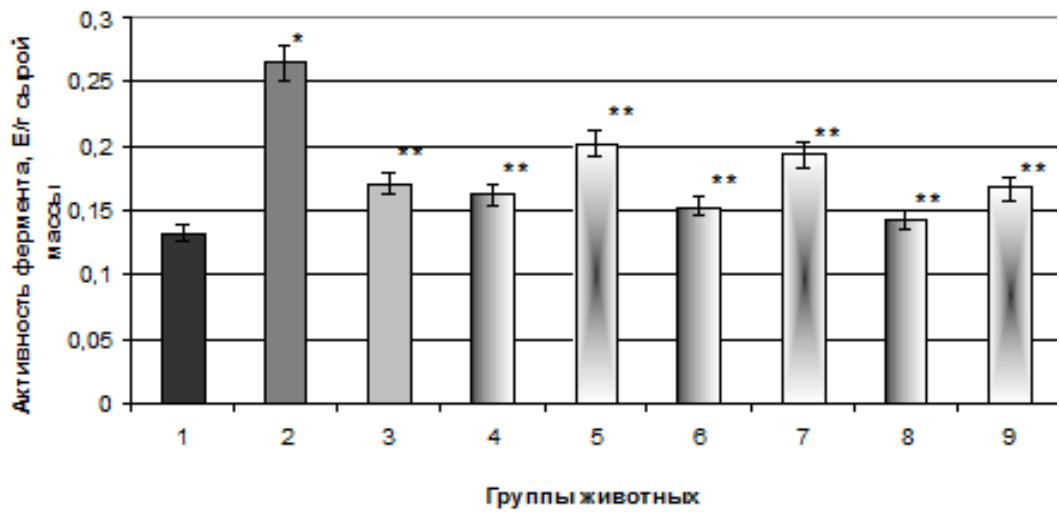


Рис. 6. Активность каталазы, выраженная в Е/г сырой массы в печени (А), почках (Б), сердце (Г) и в Е/мл в сыворотке крови (В) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

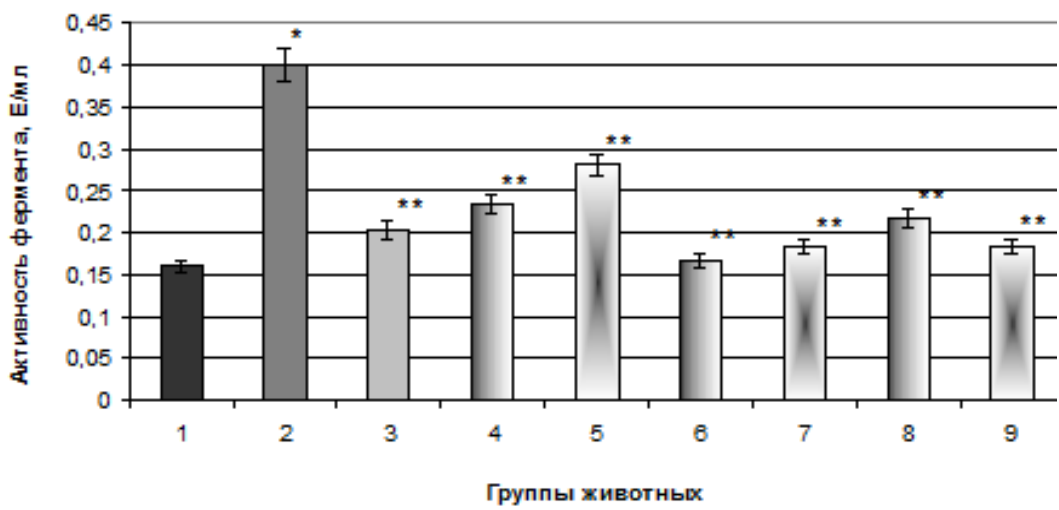
Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



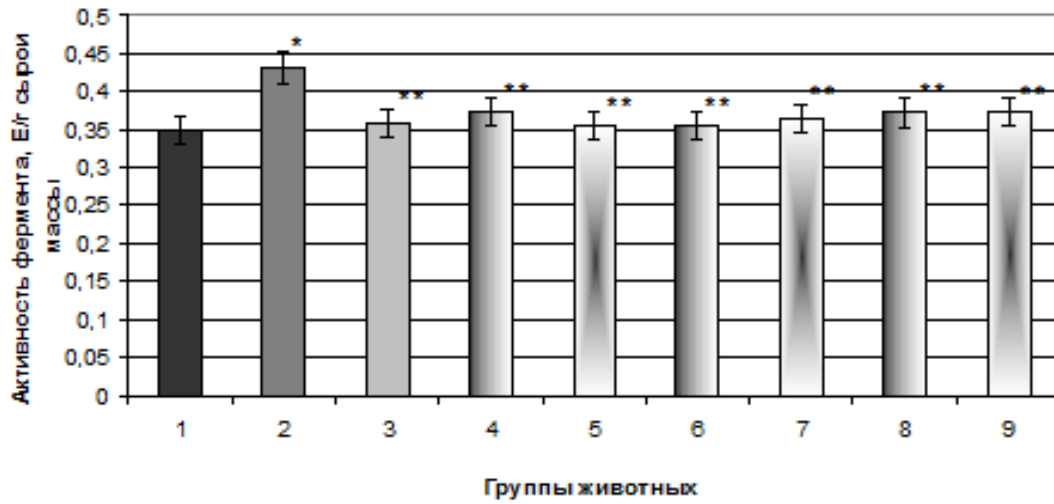
А



Б



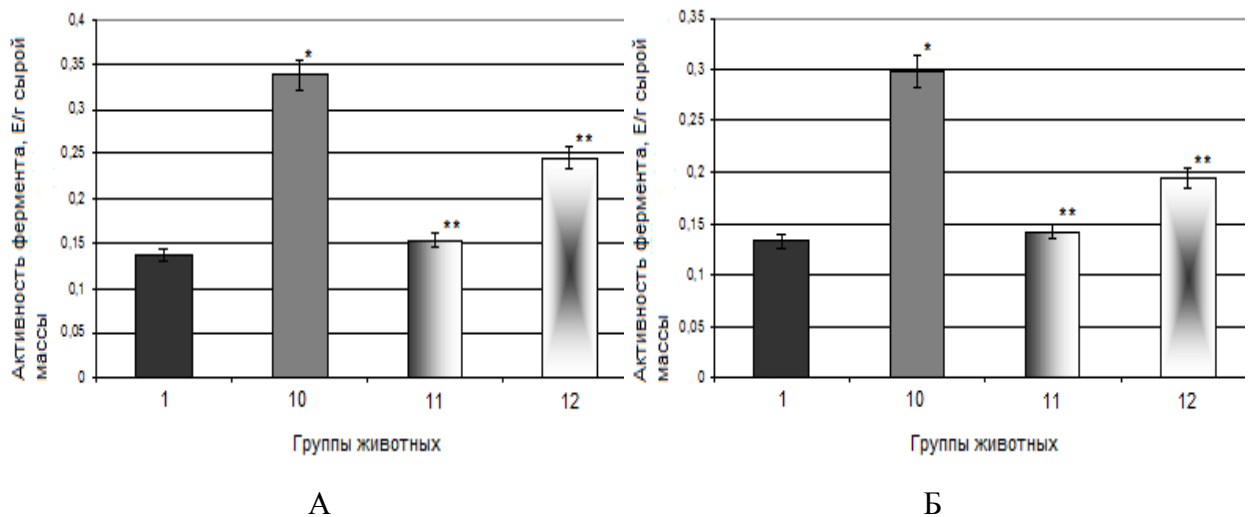
В



Г

Рис. 7. Активность глутатионпероксидазы, выраженная в Е/г сырой массы в печени (А), почках (Б), сердце (Г) и в Е/мл в сыворотке крови (В) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



А

Б

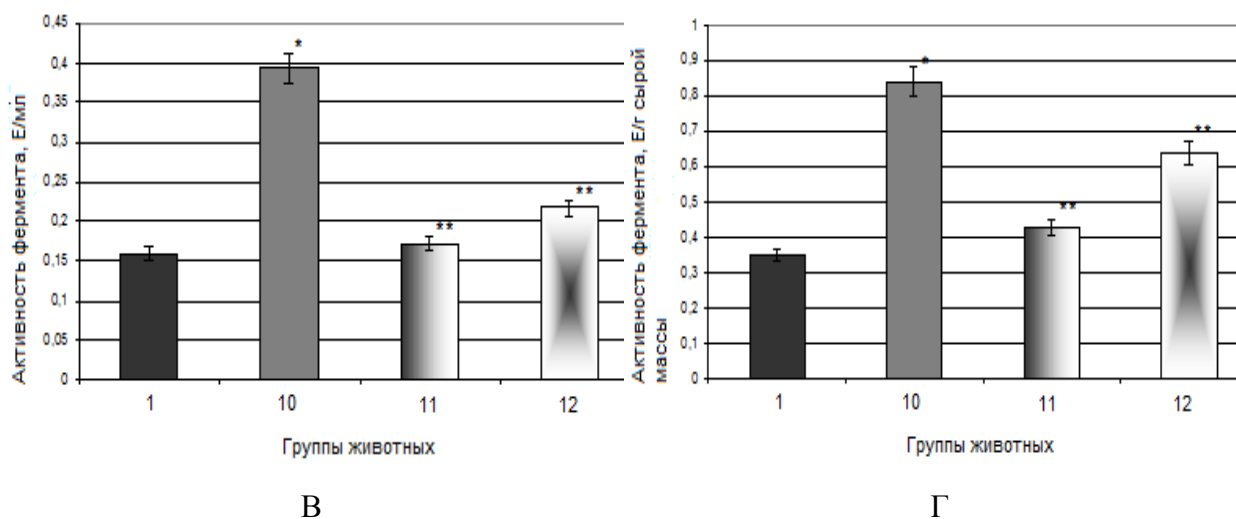
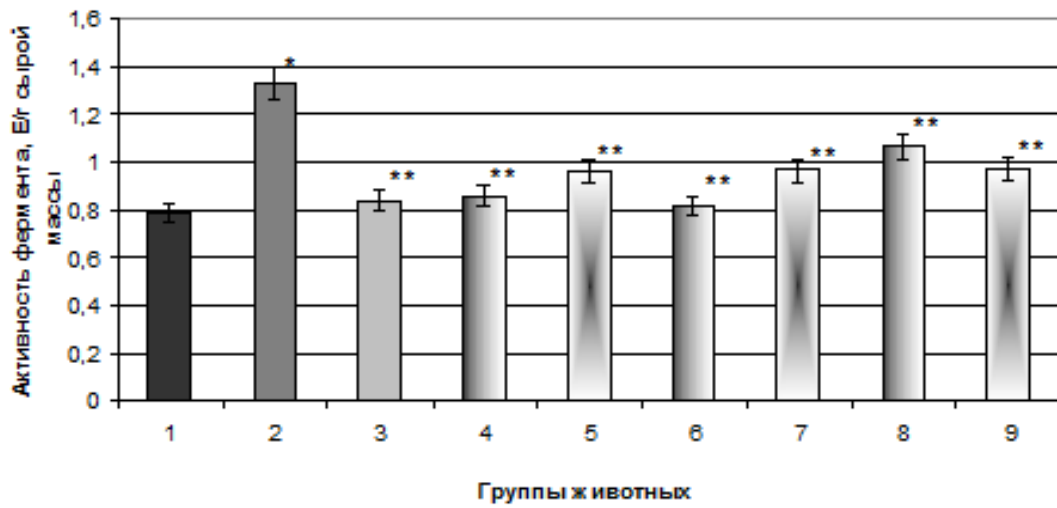
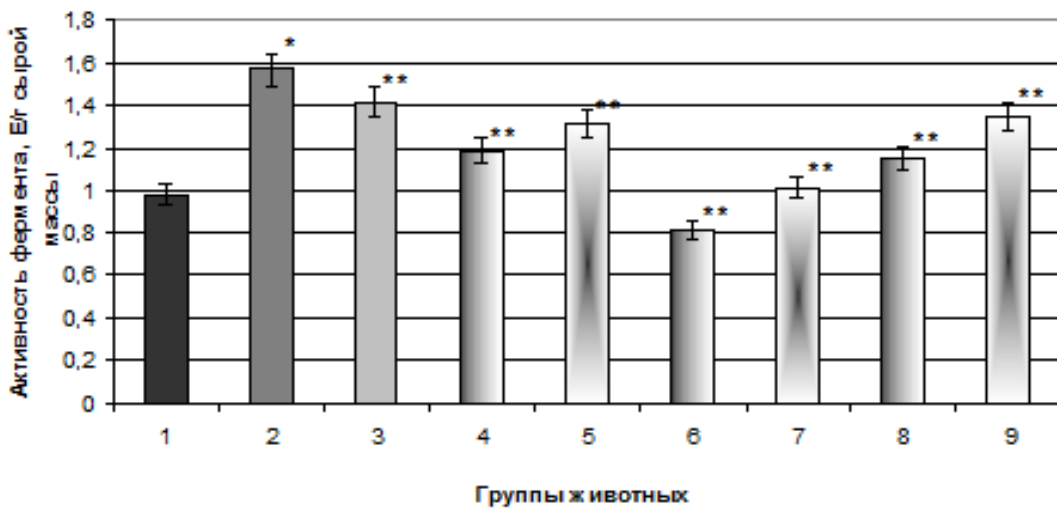


Рис. 8. Активность глутатионпероксидазы, выраженная в Е/г сырой массы в печени (А), почках (Б), сердце (Г) и в Е/мл в сыворотке крови (В) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

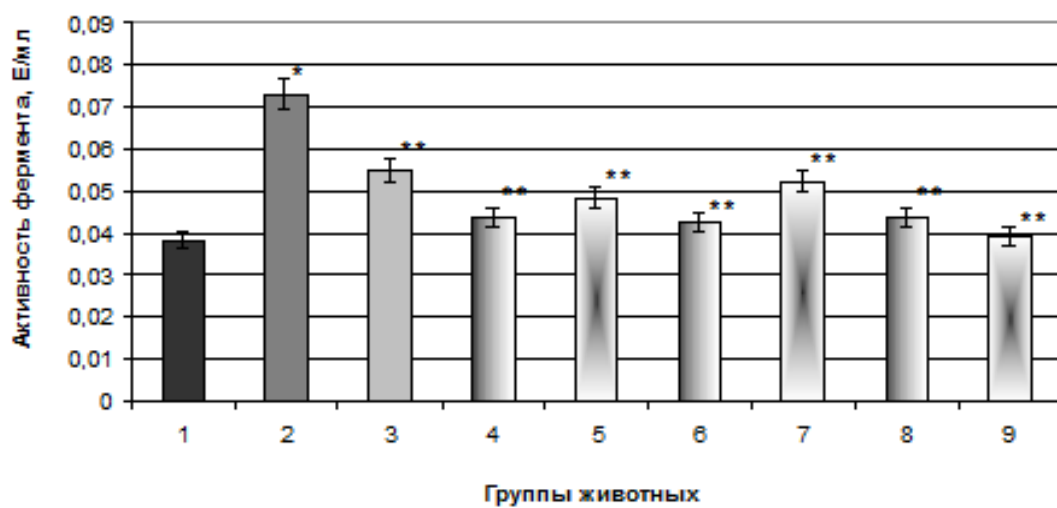
Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



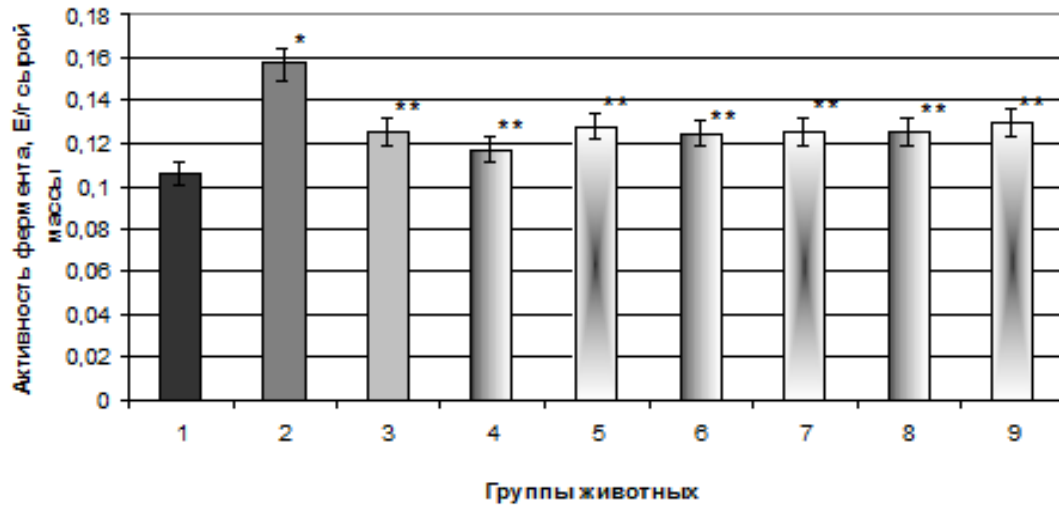
А



Б



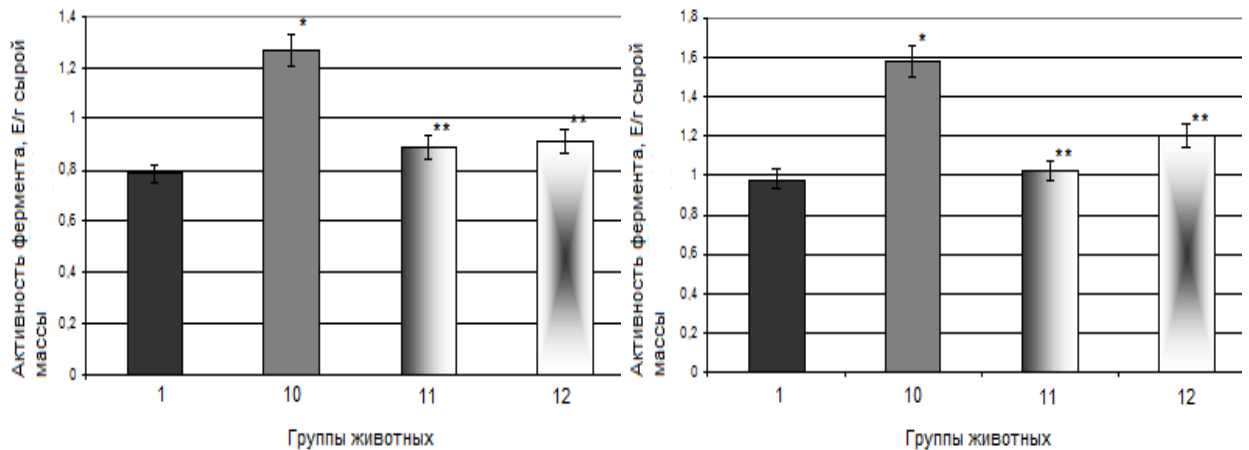
В



Г

Рис. 9. Активность глутатионредуктазы, выраженная в E/g сырой массы в печени (А), почках (Б), сердце (Г) и в E/мл в сыворотке крови (В) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамина-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



А

Б

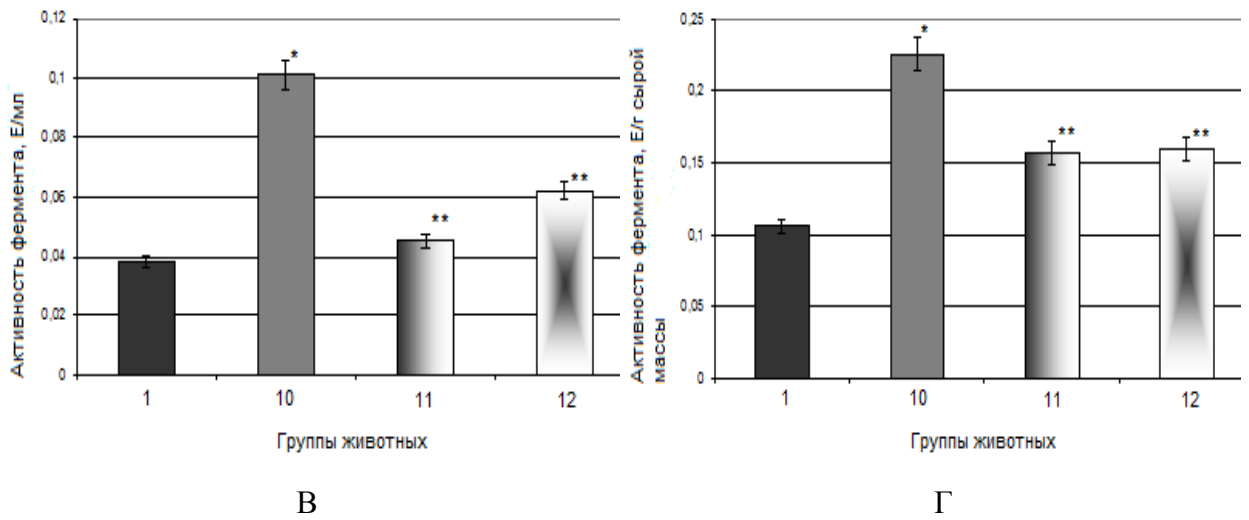
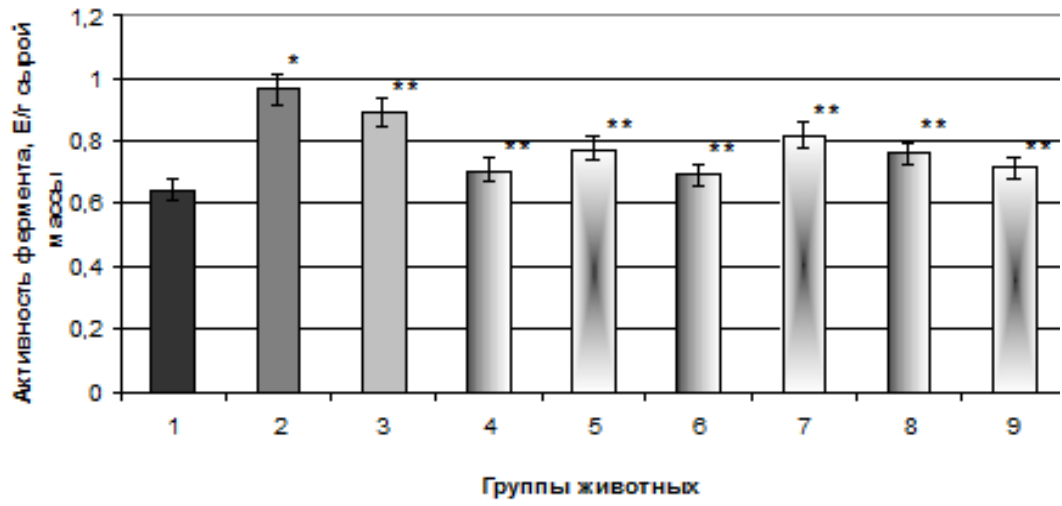
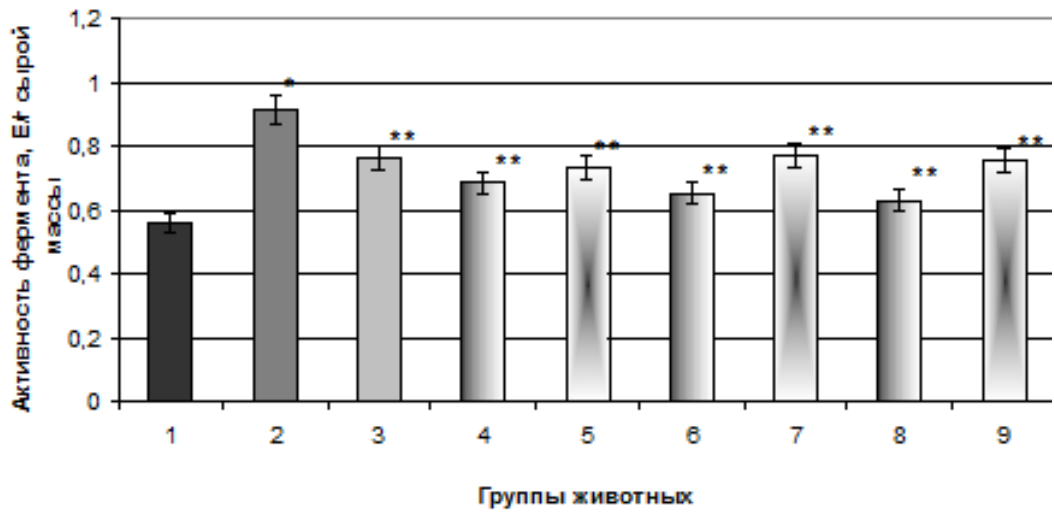


Рис. 10. Активность глутатионредуктазы, выраженная в Е/г сырой массы в печени (А), почках (Б), сердце (Г) и в Е/мл в сыворотке крови (В) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

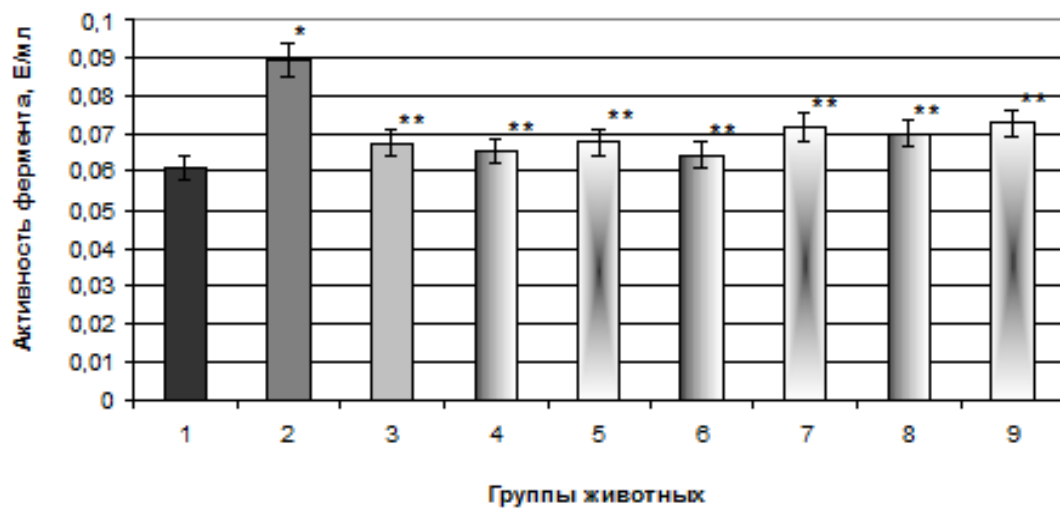
Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



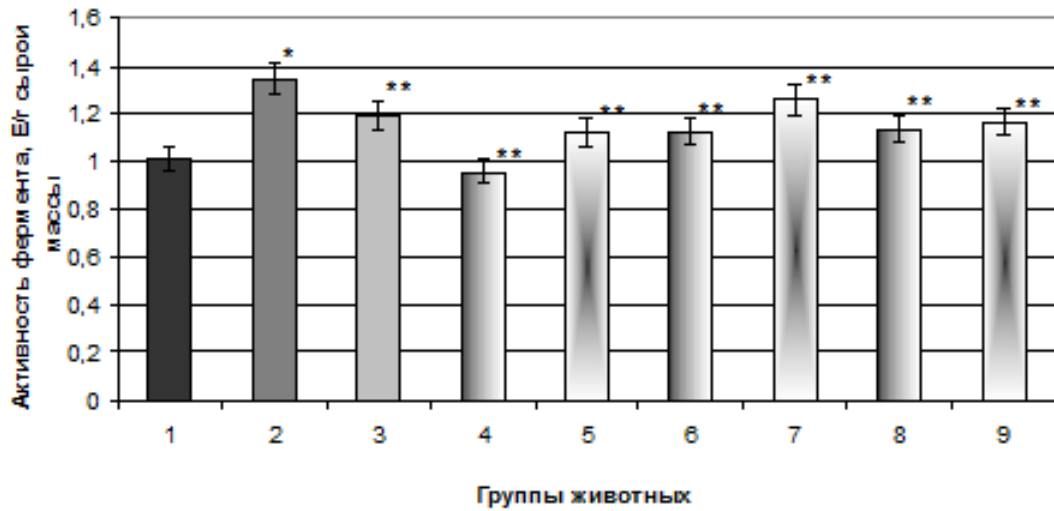
А



Б



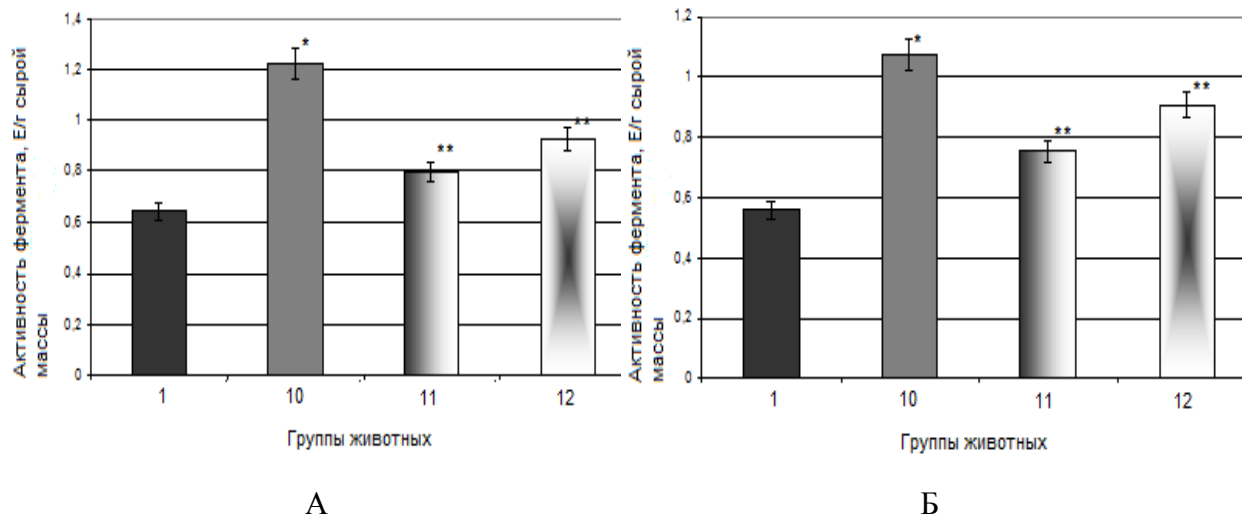
В



Г

Рис. 11. Активность глутатионтрансферазы, выраженная в Е/г сырой массы в печени (А), почках (Б), сердце (Г) и в Е/мл в сыворотке крови (В) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамина-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



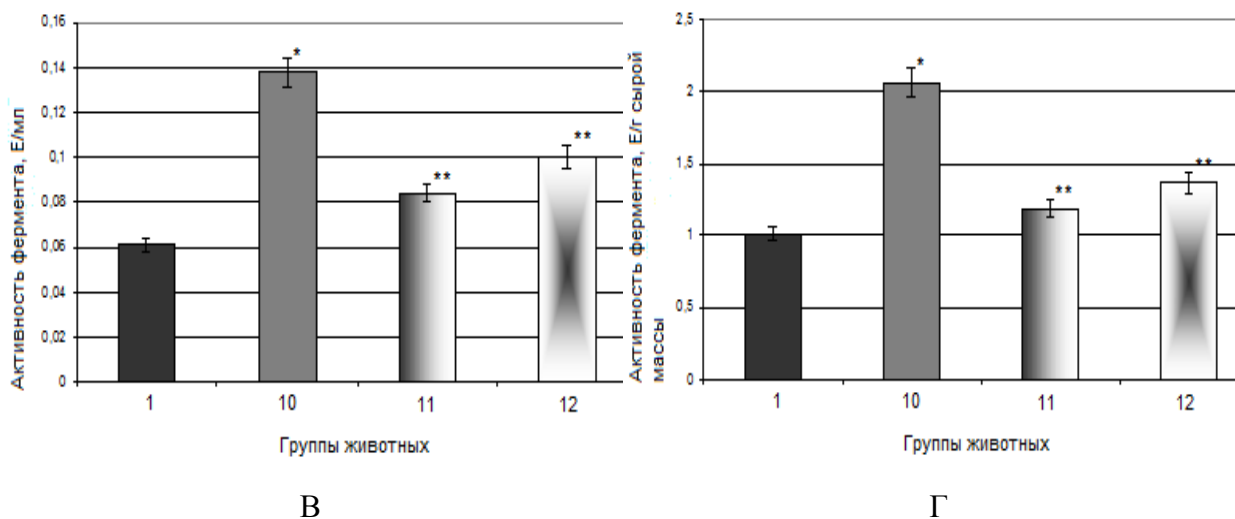
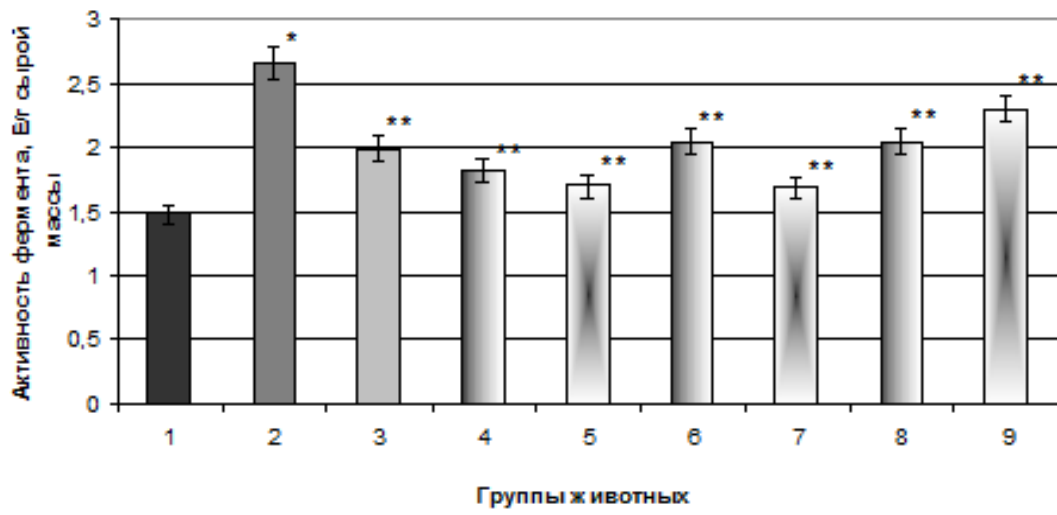
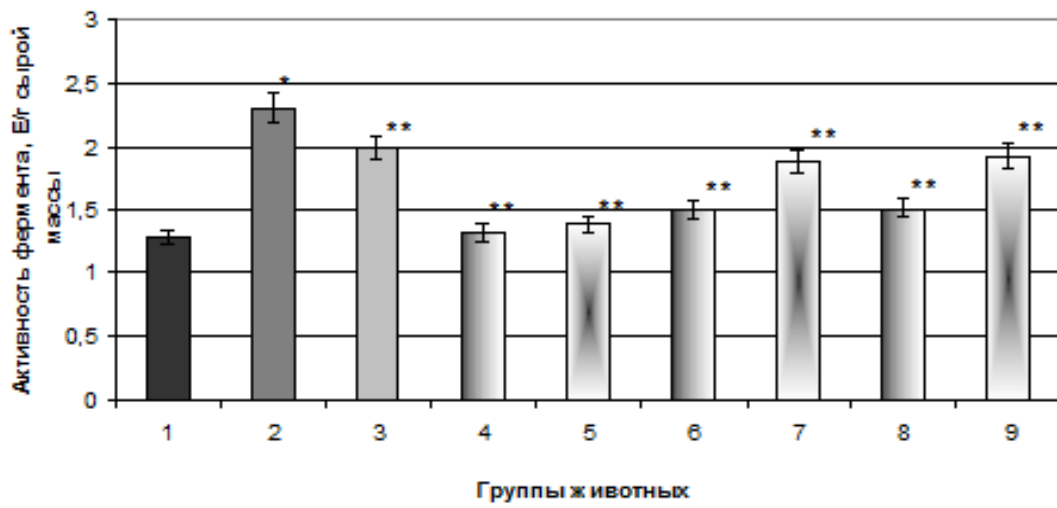


Рис. 12. Активность глутатионтрансферазы, выраженная в Е/г сырой массы в печени (А), почках (Б), сердце (Г) и в Е/мл в сыворотке крови (В) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

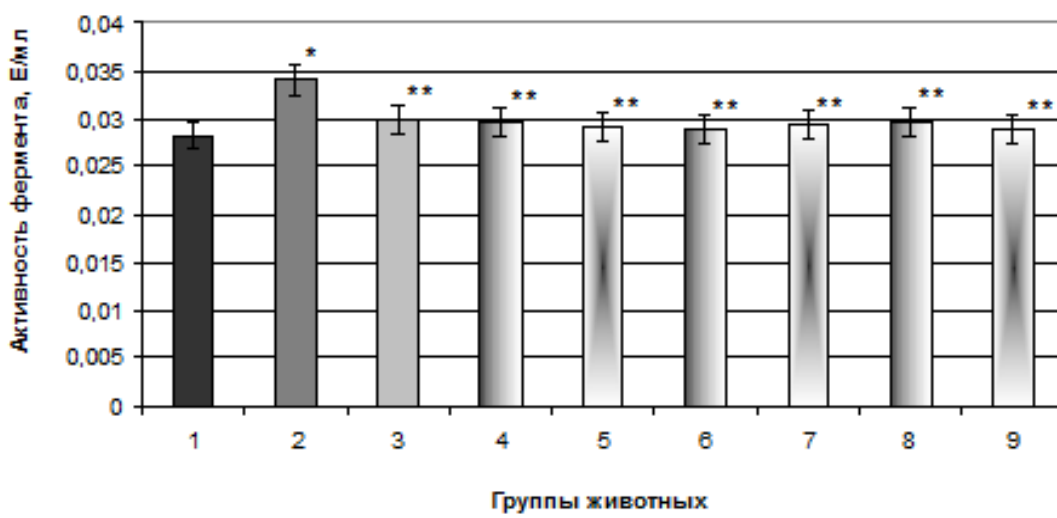
Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



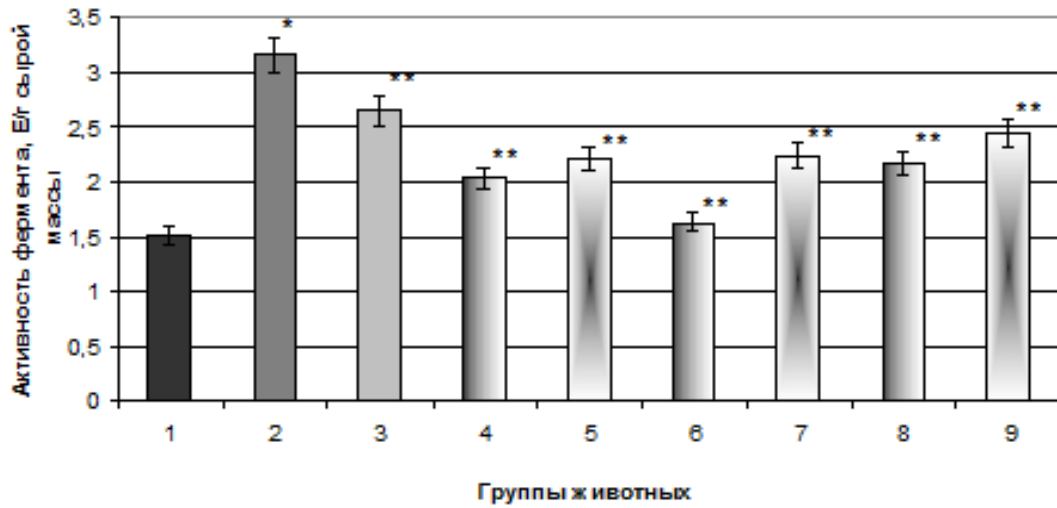
А



Б



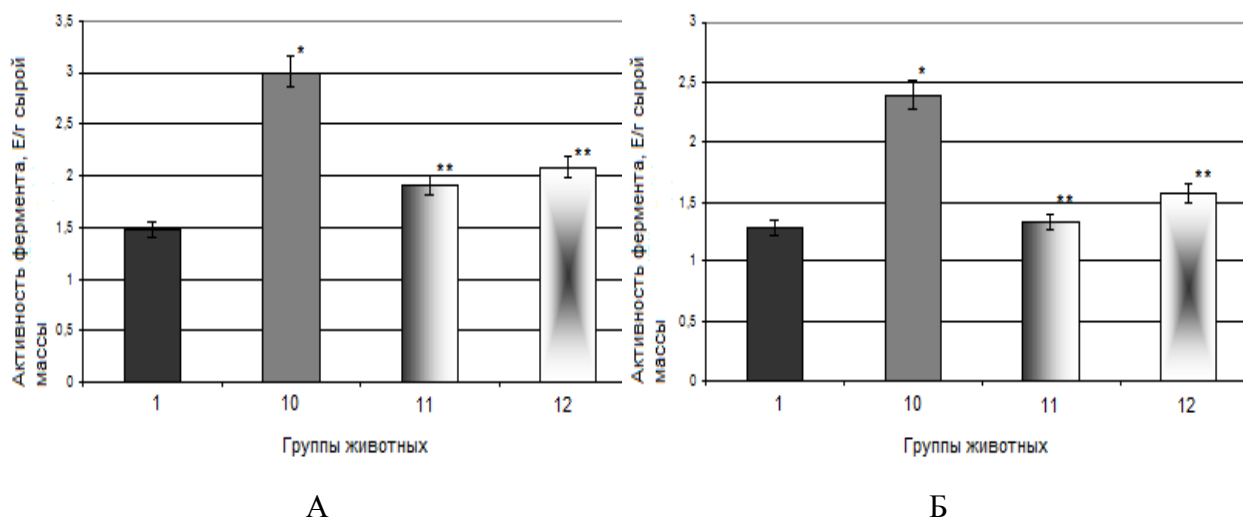
В



Г

Рис. 13. Активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы, выраженная в Е/г сырой массы в печени (А), почках (Б), сердце (Г) и в Е/мл в сыворотке крови (В) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



А

Б

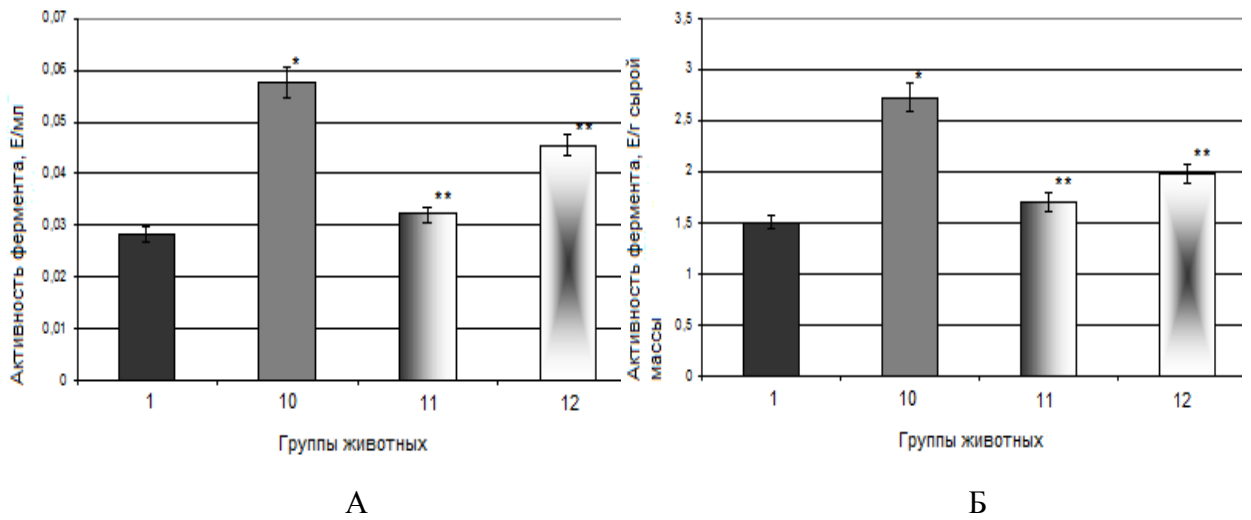
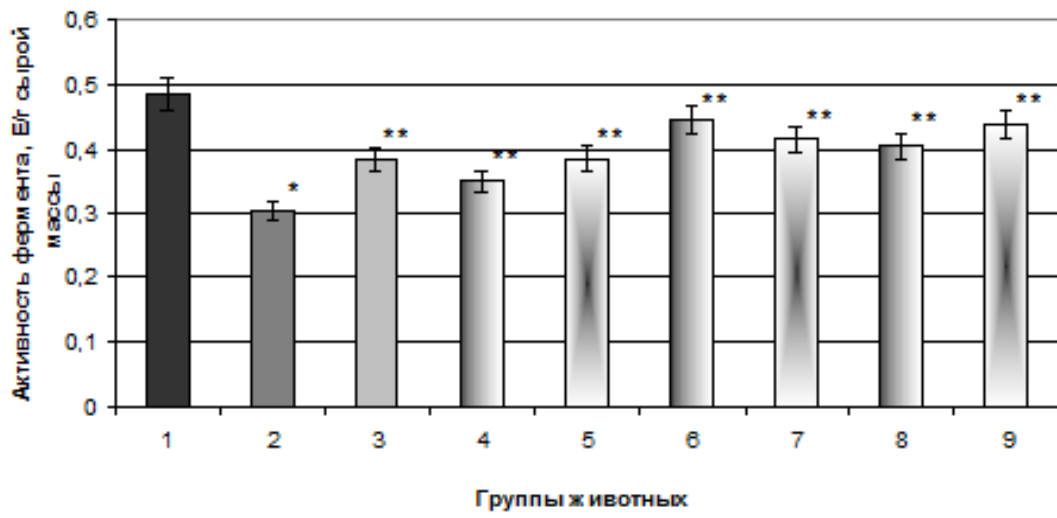
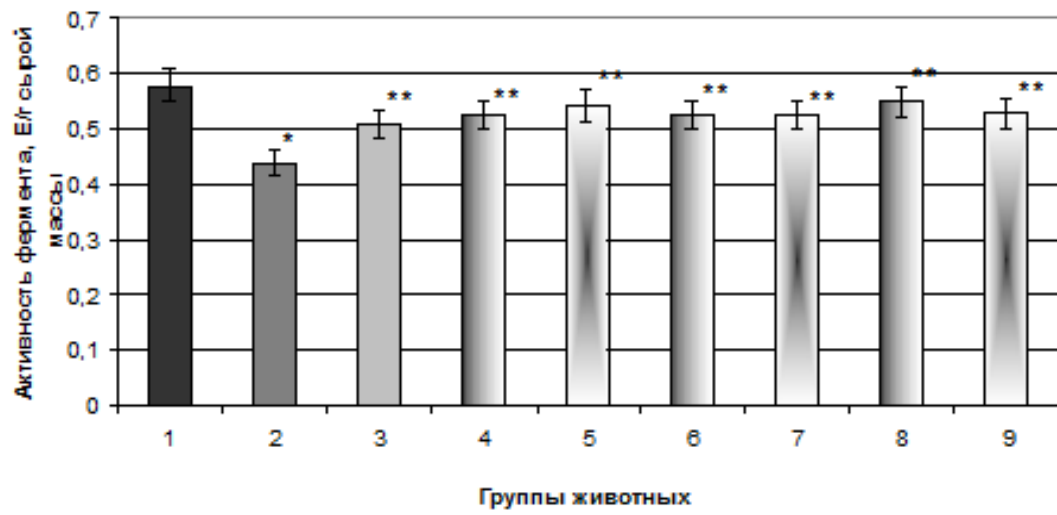


Рис. 14. Активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы, выраженная в Е/г сырой массы в печени (А), почках (Б), сердце (Г) и в Е/мл в сыворотке крови (В) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

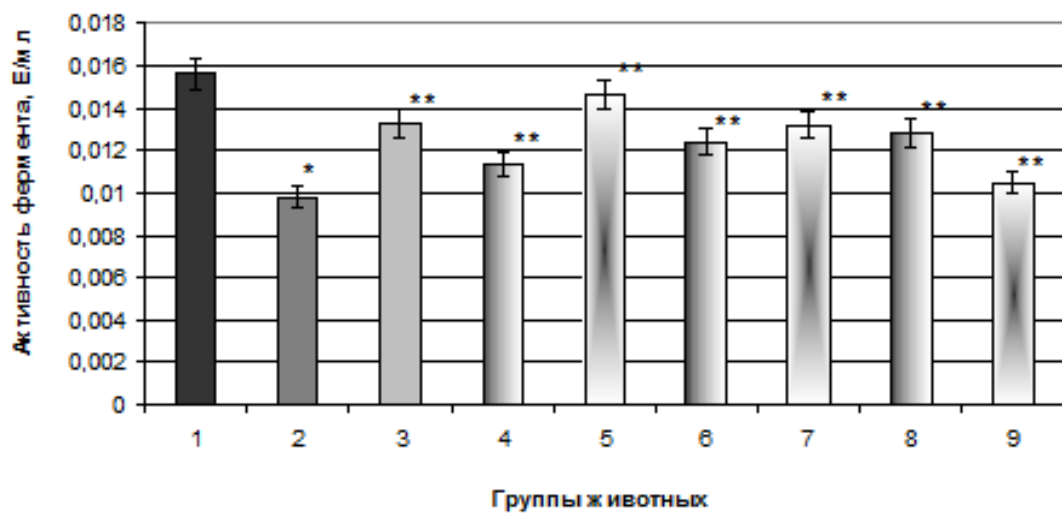
Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии



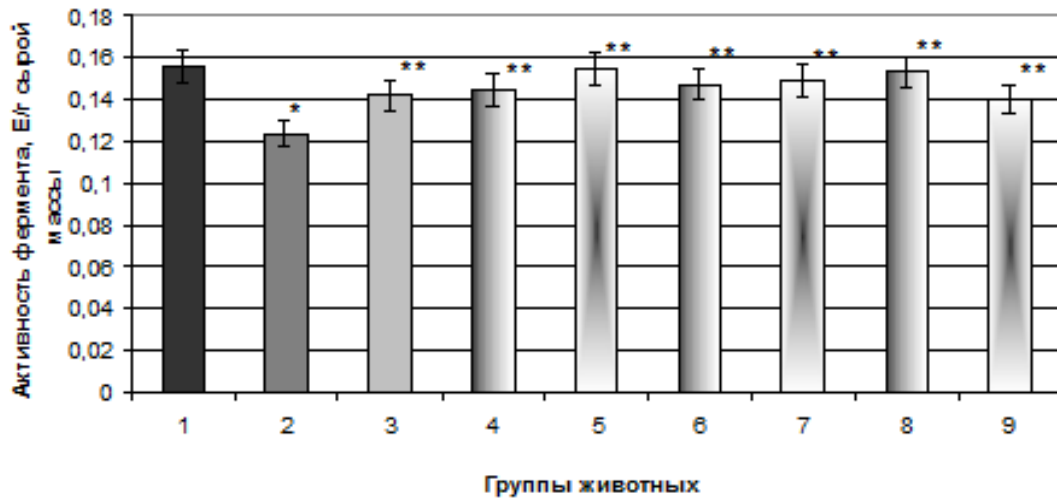
А



Б

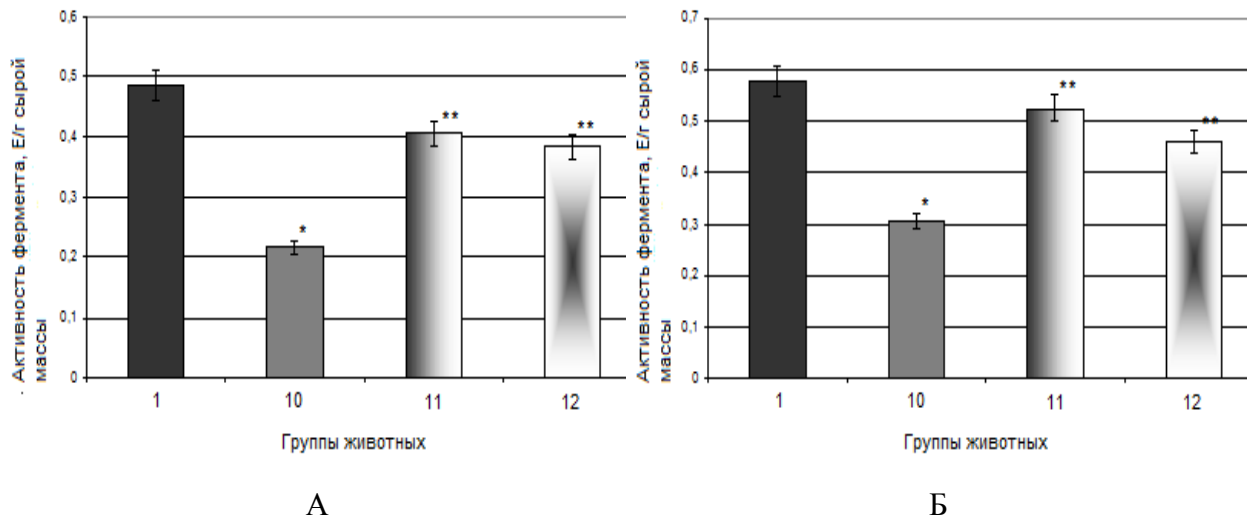


В



Г

Рис. 15. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, выраженная в E/g сырой массы в печени (А), почках (Б), сердце (Г) и в E/мл в сыворотке крови (В) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ (5), в дозе 15 мг/кг НИПМГ (6) и ДКБ (7), в дозе 25 мг/кг НИПМГ (8) и ДКБ (9) *Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии*



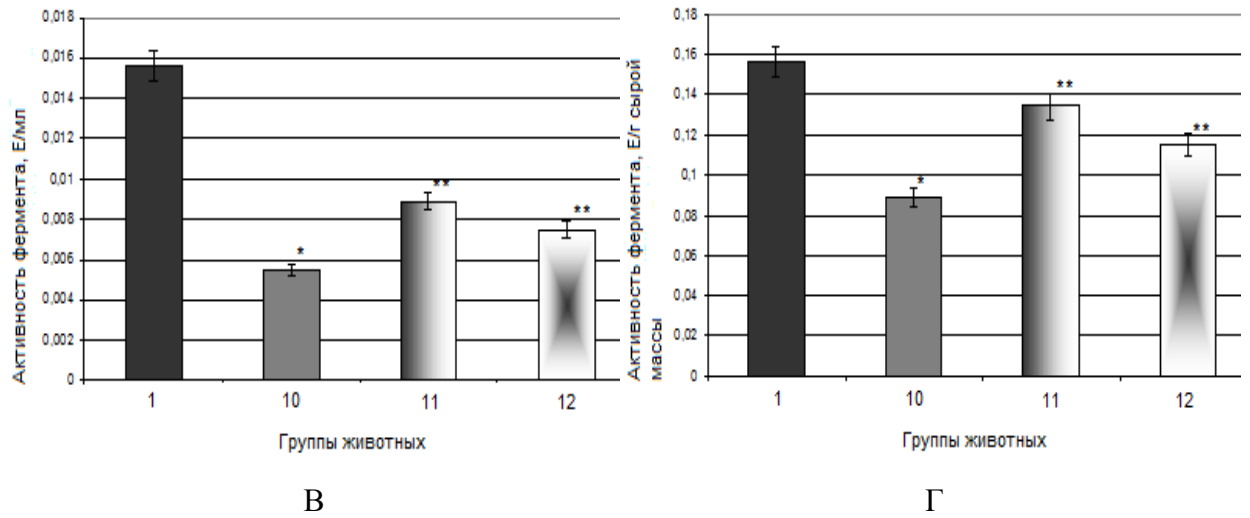


Рис. 16. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, выраженная в Е/г сырой массы в печени (А), почках (Б), сердце (Г) и в Е/мл в сыворотке крови (В) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозотином (10), при введении животным с патологией в дозе 15 мг/кг НИПМГ (11) и ДКБ (12)

Различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, ** - относительно патологии