

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж - 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО «ВГУ»)

Научный руководитель доктор биологических наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ,
Попова Татьяна Николаевна

Официальные оппоненты: **Архипенко Юрий Владимирович**
доктор биологических наук, профессор,
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
лаборатория адаптационной медицины,
главный научный сотрудник

Котова Юлия Александровна
кандидат медицинских наук, ФГБОУ ВО
«Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
кафедра поликлинической терапии, доцент

Ведущая организация ФГУ «Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук» (ФИЦ
Биотехнологии РАН)

Защита диссертации состоится «14» мая 2019 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д.212.038.03 при Воронежском государственном университете по адресу: 394018, Воронеж, Университетская пл., 1, ауд. 59.

Автореферат диссертации размещен на официальном сайте Минобрнауки Российской Федерации и на сайте Воронежского государственного университета <http://www.science.vsu.ru>.

С диссертацией можно ознакомиться в зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета

Автореферат разослан «12» марта 2019 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук



Грабович М.Ю.

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 (Балаболкин М.И., 2002; Майоров А.Ю., 2013). 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 (Evans J.L., 2002).

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 (Szabó C., 1997; Musi N., 2002; Lee S., 2005). 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 (Klip A., 1990; Matthaei S., 1999; Kirpichnikov D., 2002). Вместе с тем, на данный момент единственным бигуанидом, рекомендованным для

фармакотерапии больных СД2 является метформин (Davidson M.B., 1997; Cusi K., 1998; Смирнова О.М., 2010).

Таким образом, актуальной задачей представляется исследование воздействия НИПМГ и ДКБ на антиоксидантный статус при гипергликемии в эксперименте на животных и анализ целесообразности их дальнейших 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- [(карбамимидаметанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата, на уровень гликемии, интенсивность свободнорадикальных процессов и функционирование антиоксидантной системы (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- [(карбамимидаметанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата.

3. Анализ воздействия НИПМГ, ДКБ и метформина (препарат сравнения) на интенсивность протекания свободнорадикальных процессов (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 НИМПП, 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 государственного университета.

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 «Фармообразование-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 государственного университета (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-[(карбамимидамометанимидоил)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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект и материалы исследования: Для проведения исследований использовали гомогенат печени, почек, сердца, а также сыворотку крови белых лабораторных крыс-самцов массой 200-250 г. В ходе эксперимента животные были разделены на 12 групп: 1-я – контрольные животные, содержащиеся на стандартном режиме вивария (n=20); 2-ю группу составляли животные с гипергликемией, развивающейся в результате введения протамин-сульфата

(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 (n=20) (Ульянов А.М., 2000); 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 (Sigma-Aldrich Co., США) в дозе 30 мг/кг в объеме 0,5 мл цитратного буфера (pH 4,4) дважды с интервалом в неделю после месячной жировой диеты (n=15) (Zhang M., 2009); 11-ю и 12-ю группы составили животные с гипергликемией, возникающей 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. Далее наркотизированных животных всех экспериментальных групп умерщвляли и забирали материал для дальнейших исследований.

Подготовка материала для исследования. Печень перед извлечением из брюшной полости перфузировали *in situ* ледяным 0,9% раствором NaCl. Затем 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. Затем 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. Венозную кровь набирали в чистую стеклянную пробирку без антикоагулянта и помещали на 0,5 часа в термостат при температуре 37°C, после расслаивания фаз собирали супернатант и центрифугировали его при 4000g в течение 10 мин. Полученную сыворотку использовали для дальнейшего исследования.

Определение токсичности исследуемых соединений. Расчет среднелетальных доз осуществляли по методу Беренса с использованием приема накопленных частот (Лысенко Н.Н., 2015).

Определение уровня гликемии. Контроль развития гипергликемии осуществляли путем определения концентрации глюкозы в сыворотке крови крыс глюкозооксидазным методом на последней неделе эксперимента при применении стрептозоциновой модели и на 15-, 17- и 19-е сутки при индукции гипергликемии с помощью протамин-сульфатной модели.

Оценка оксидативного статуса. Интенсивность СО оценивали с помощью метода биохемилюминесценции (БХЛ), индуцированной сульфатом железа и пероксидом водорода на биохемилюминометре БХЛ-07 с программным обеспечением. Кинетическую кривую БХЛ регистрировали в течение 30 секунд и определяли такие параметры, как интенсивность вспышки (I_{\max}), светосумму (S), и величину тангенса угла наклона кривой ($\text{tg}\alpha$). Уровень ДК определяли спектрофотометрически при длине волны 233 нм.

Оценку степени развития апоптотических процессов осуществляли на основе анализа фрагментации ДНК. Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов «К-Сорб» (Синтол, Россия). Последующую визуализацию фрагментов ДНК осуществляли методом агарозного геле-электрофореза с окрашиванием бромистым этидием.

Определение степени окислительной модификации белков (ОМБ). Для оценки степени ОМБ использовали метод, основанный на взаимодействии окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенил-гидразонов (Дубинина Е.Е., 1995).

Определение активности ферментов проводили на спектрофотометре Hitachi U-1900 с программным обеспечением. О скорости ферментативных реакций, сопряженных с окислительно-восстановительными превращениями НАДФ, судили по изменению оптической плотности при 340 нм. Скорость ГР-реакции определяли по уменьшению оптической плотности в результате окисления НАДФН при протекании двух сопряженных реакций: генерации окисленного глутатиона (GSSG) под действием ГП и его последующего восстановления под действием ГР с использованием НАДФН. Активность ГР определяли спектрофотометрически по падению оптической плотности в результате окисления НАДФН. О скорости ГТ-реакции судили по возрастанию оптической плотности в ходе реакции с 1-хлор, 2,4-динитробензолом. Об активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДФ-ИДГ) судили по увеличению оптической плотности в результате восстановления НАДФ. Активность аконитатгидратазы (АГ) определяли спектрофотометрически при 233 нм. Активность СОД определяли при 540 нм по ингибированию скорости восстановления нитросинего тетразолия в неэнзимотической системе феназинметасульфата и НАДН (Гунько И.Н., 2002). В основе метода определения каталазы лежит способность пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс, имеющий максимум поглощения при длине волны 410 нм (Королюк М.А., 1988). Содержание общего белка определяли унифицированным методом по биуретовой реакции.

Определение содержания компонентов неферментативной антиоксидантной системы. Содержание GSH определяли с помощью реакции его взаимодействия с 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой. В ходе

данной реакции в эквимольных количествах образуется тионитрофенильный анион, имеющий максимум поглощения при 412 нм (Брусков В.И., 2001). Определение содержания цитрата проводили по методу Нательсона (Афанасьев В.Г., 1973).

Определение уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов. Выделение суммарной клеточной РНК производили с использованием набора «РНК-Экстран» (Синтол, Россия). Для синтеза первой цепи комплиментарной ДНК использовали рекомбинантную обратную транскриптазу вируса мышинного лейкоза Молони – М-МиLV. В качестве затравочного праймера использовали смесь праймеров олиго-(dT)₁₅+Random. Для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green 1 использовали набор реактивов фирмы «Синтол» (Россия) и комплект генспецифичных праймеров. Исследование проводили на приборе АНК-32. Уровень транскриптов исследуемых генов оценивали относительно гена «домашнего хозяйства» - глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (*GAPDH*) и гена бета-актина (*ACTB*). Определение относительного уровня экспрессии генов осуществляли с применением $2^{-\Delta\Delta Ct}$ метода (Livak K.J., 2001).

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 вариант нормальному распределению использовали критерий Колмогорова - Смирнова в модификации Лиллиефорса. Результаты исследования обрабатывали с использованием показателей описательной статистики. Полученные результаты опытных образцов сравнивали с контролем. На рисунках и в таблицах 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 $p < 0,05$ (Ллойд Э., 1990).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ N-[ИМИНО(1-ПИПЕРИДИНИЛ)МЕТИЛ]ГУАНИДИНА И 1,3-ДИМЕТИЛ 5-[(КАРБАМИДАМИДОМЕТАНИМИДОИЛ)АМИНО]БЕНЗОЛ-1,3-ДИКАРБОКСИЛАТА

Целью изучения острой токсичности являлось определение переносимых, токсических и летальных доз (ЛД) исследуемых бигуанидиновых производных - НИПМГ и ДКБ, согласно руководству по доклиническому изучению лекарственных средств (Миронов А.Н., 2012). При изучении острой токсичности 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 (табл.1-2). По методу Беренса вычислены ЛД₅₀ (НИПМГ) = 561,7 \pm 28,1 мг/кг, ЛД₅₀ (ДКБ) = 620,6 \pm 31,0 мг/кг. С учетом полученных значений и классификации токсичности веществ по Березовской И.В. НИПМГ и ДКБ можно отнести к классу малотоксичных соединений (Березовская И.В., 2003).

Таблица 1. Расчет среднелетальной дозы НИПМГ для лабораторных крыс

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

Таблица 2. Расчет среднелетальной дозы ДКБ для лабораторных крыс

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

ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ БИГУАНИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА УРОВЕНЬ ГЛИКЕМИИ У КРЫС

В ходе эксперимента было установлено, что введение крысам НИПМГ, ДКБ и препарата сравнения (метформина) во всех исследуемых дозах приводило к снижению концентрации глюкозы в сыворотке крови животных, возрастающей при патологии. Так, введение НИПМГ в дозе 10 мг/кг, также как и метформина, при реализации протамин-сульфатной модели индукции гипергликемии, приводило к снижению уровня глюкозы на 19 сутки после начала эксперимента в 2,6 раза. При введении ДКБ в той же дозе уровень гликемии у крыс при патологии, индуцированной протамин-сульфатом, снижался в 2,2 раза. При гипергликемии, вызванной введением стрептозоцина, НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг оказывали сходный эффект (рис. 1).

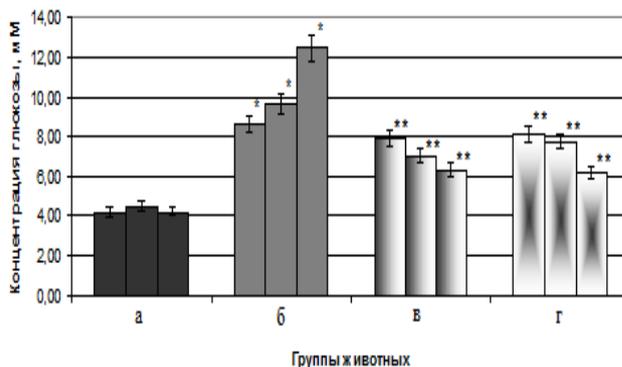


Рис. 1. Изменения концентрации глюкозы в крови животных контрольной группы (а), в группе с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (б), при введении НИПМГ (в) и ДКБ (г) в дозе 15 мг/кг животным с патологией

Примечание: здесь и на рисунках 2, 3, 5, 6, 8 различия достоверны при $p < 0,05$: *- относительно контроля, ** - относительно патологии

Можно предположить, что наблюдаемый гипогликемический эффект связан со способностью бигуанидиновых производных, в том числе НИПМГ и ДКБ, повышать чувствительность к инсулину периферических тканей (преимущественно поперечно-полосатой мускулатуры, в меньшей степени – жировой ткани) (Балаболкин М.И., 2001). Нельзя исключить, что 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 (Смирнова О.М., 2010).

ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ БИОСУБСТРАТОВ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

В ходе исследования было установлено, что при введении бигуанидиновых производных наблюдается снижение значений параметров БХЛ, возрастающих при развитии гипергликемии, индуцированной как протамин-сульфатом, так и стрептозоцином. Так, величина S при действии НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг на фоне развития гипергликемии, вызванной введением протамин-сульфата, снижалась в печени – в 2,5 и 1,5 раза, в почках – в 1,5 и 1,3 раза, в сердце – в 2,2 и 1,7 раза, в сыворотке крови – в 2,2 и 1,3 раза относительно данных, полученных при патологии. Введение животным с патологией метформина приводило к снижению величины S в 1,6 раза в печени, в 1,5 раза в почках, в 1,7 раза в сыворотке крови и сердце. 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.

Значения такого параметра БХЛ как I_{\max} снижались под действием НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг в печени в 1,4 и 1,2 раза, в почках – в 1,9 и 1,5 раза, в сердце – в 2,5 и 2,4 раза и в сыворотке крови – в 1,3 раза соответственно. Введение животным с патологией метформина приводило к снижению величины I_{\max} в 1,2 раза в печени и сердце, в 1,8 раза в почках, в 1,4 раза в сыворотке крови. Действие НИПМГ и ДКБ в той же дозе при индукции гипергликемии с помощью стрептозоцина изменяло в сторону контрольных значений величину 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. Уменьшение уровня СО может быть результатом проявления антиоксидантных свойств бигуанидиновых производных.

В ходе эксперимента было выявлено изменение значений $tg\alpha_2$ в направлении контроля под воздействием метформина, НИПМГ и ДКБ на фоне развития гипергликемии, вызванной введением протамин-сульфата. Причем, изменения значений $tg\alpha_2$, полученные при введении крысам с гипергликемией препарата сравнения были в большинстве случаев выражены менее значительно. Также, происходило снижение $tg\alpha_2$ при введении НИПМГ и ДКБ на фоне стрептозоциновой модели развития гипергликемии у крыс. Это, вероятно, может быть связано с уменьшением степени мобилизации АОС в условиях торможения свободнорадикальных процессов.

Введение бигуанидиновых производных животным с гипергликемией, вызванной введением как протамин-сульфата, так и стрептозоцина, приводило к снижению уровня первичных продуктов перексидного окисления липидов (ПОЛ), возрастающего при патологии (рис. 2).

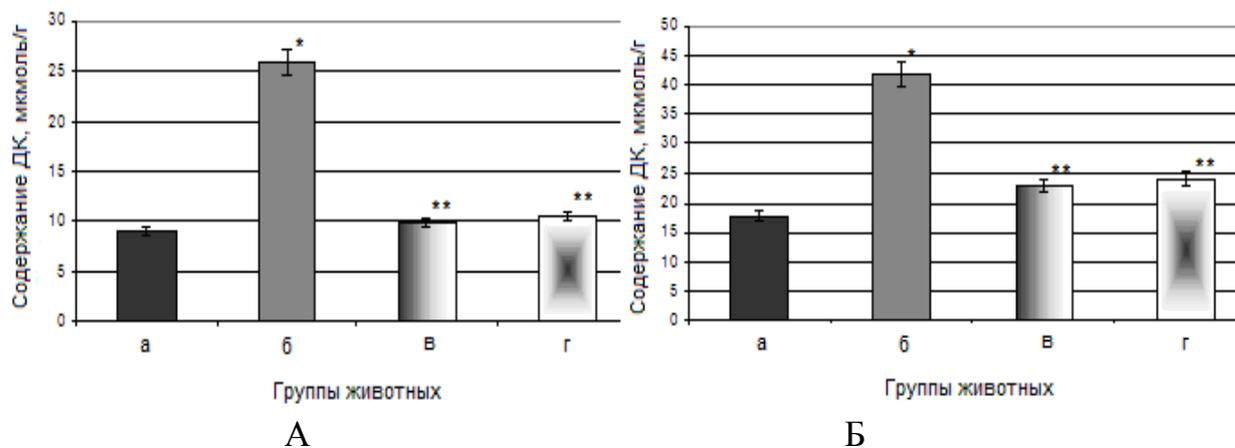


Рис. 2. Содержание диеновых конъюгатов в печени (А) и сердце (Б) крыс контрольной группы (а), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (б), при введении в дозе 15 мг/кг НИПМГ (в) и ДКБ (г) животным с патологией

Так, введение препарата сравнения, НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг животным с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом, приводило к снижению уровня ДК в печени – в 2,9, 3,0 и 3,4 раза, в почках – в 1,4, 1,8 и 2,0 раза и в сердце – в 1,8, 2,3 и 2,1 раза. В сыворотке крови крыс уровень ДК снижался в 1,3 раза при введении метформина и ДКБ, и в 1,2 раза при введении НИПМГ. При реализации стрептозоциновой модели индукции гипергликемии введение НИПМГ и ДКБ в той же дозе 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 сердце – в 1,8 и 1,7 раза соответственно (рис. 2).

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. 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. При введении метформина, НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг экспериментальным животным с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом, содержание карбонильных групп уменьшалось 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 соответственно относительно данных при патологии (рис. 3). При действии НИПМГ и ДКБ в той же дозе 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.

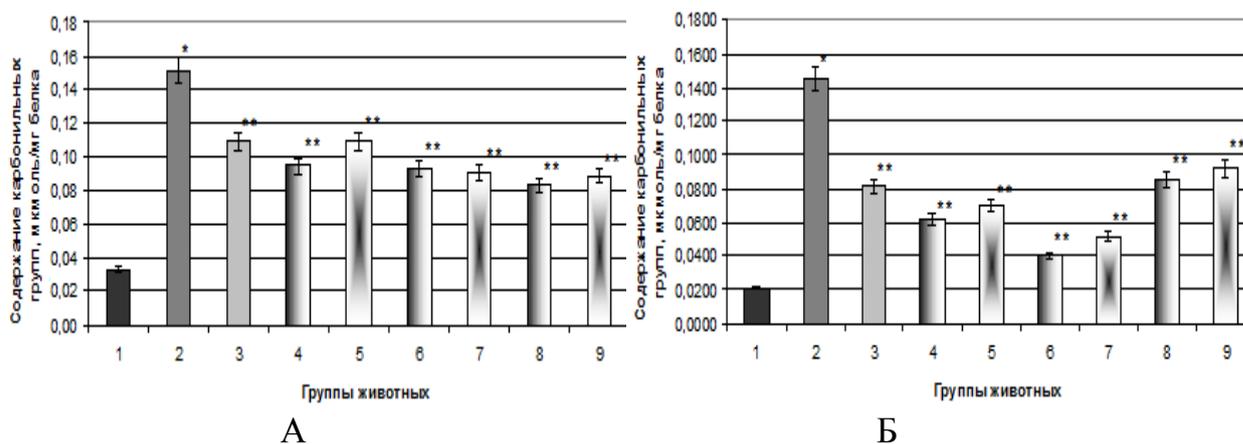


Рис. 3. Содержание продуктов окислительной модификации белков в печени (А) и сыворотке крови (Б) крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении препарата сравнения (метформина) в дозе 15 мг/кг крысам с гипергликемией (3); при введении НИПМГ (4)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

При этом наблюдалось существенное снижение степени фрагментации ДНК, возникающей при гипергликемии (рис. 4). Так, в образцах ДНК животных, которым вводили протекторы, совокупность полос, соответствующая низкомолекулярной ДНК была выражена значительно слабее, что указывает на способность исследуемых бигуанидиновых производных оказывать антиапоптотический эффект.

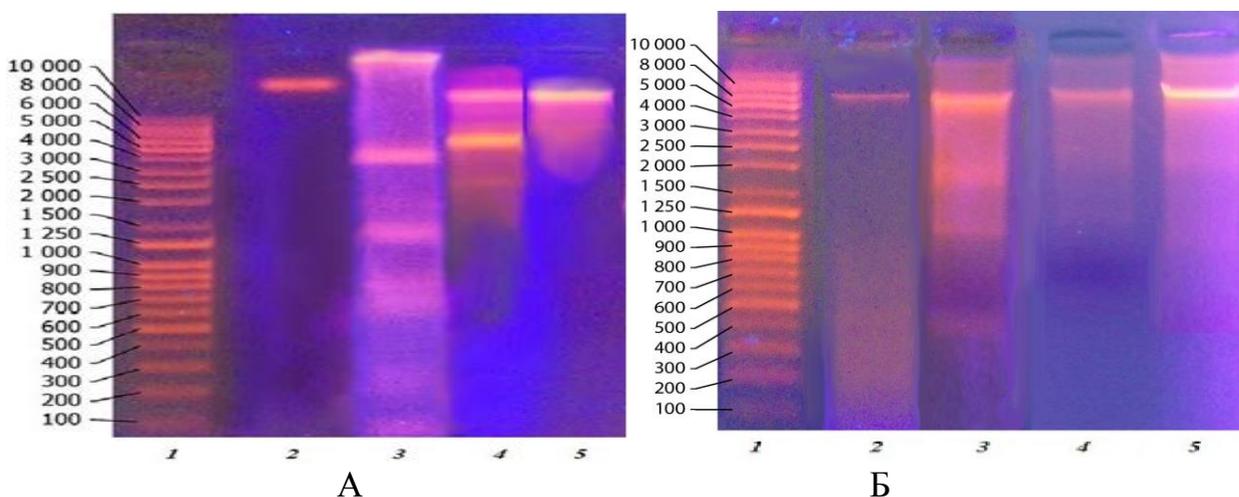


Рис. 4. Электрофореграмма препаратов ДНК из печени крыс 1 – маркеры молекулярной массы, 2 – контроль, 3 – экспериментальная гипергликемия, индуцированная протамин-сульфатом (А) и стрептозоцином (Б), 4 – введение на фоне развития патологии НИПМГ в дозе 15 мг/кг, 5 – введение на фоне развития патологии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

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии способности у НИПМГ и ДКБ оказывать позитивное регулирующее

воздействие на свободнорадикальный гомеостаз, снижая степень проявления ОС при гипергликемии.

ВОЗДЕЙСТВИЕ БИГУАНИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС ПРИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ У КРЫС

В результате проведенных исследований было установлено, что введение бигуанидиновых производных крысам с экспериментальной гипергликемией приводит к изменению активности ключевых ферментов первой линии защиты организма от СР – СОД и каталазы, в сторону снижения в тканях крыс относительно значений при патологии. Так, действие НИПМГ в дозе 15 мг/кг при гипергликемии, вызванной введением протамин-сульфата, приводило к уменьшению активности данных ферментов в печени крыс в 1,8 и 1,4 раза, в почках в 1,3 и 1,6 раза, в сыворотке крови в 1,7 раза и в сердце в 2,4 раза. При введении ДКБ в дозе 15 мг/кг удельная активность СОД и каталазы снижалась в печени крыс с гипергликемией в 1,6 и 1,2 раза, в почках – в 1,2 и 1,3 раза, в сыворотке крови в – 1,4 и 1,2 раза и в сердце – в 1,7 и 1,3 раза соответственно. Изменения активности исследуемых ферментов в тканях животных других экспериментальных групп, которым вводили протекторы в дозе 10 и 25 мг/кг, а также активность ферментов, выраженная в Е/г сырой массы ткани и Е/мл сыворотки крови, имели сходные тенденции.

Введение бигуанидиновых производных также приводило к снижению активности СОД и каталазы в тканях крыс при применении стрептозоциновой модели индукции гипергликемии. Так, действие НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг приводило к уменьшению активности СОД в печени в 1,5 и 1,3 раза, в почках – в 1,8 и 1,3 раза, в сыворотке крови – в 1,9 и 1,7 раза и в сердце – в 2,2 и 1,7 раза (рис. 5). Удельная активность каталазы снижалась на 21 и 48% в печени, на 68 и 52% в почках, на 47 и 60% в сыворотке крови и на 53 и 63% в сердце крыс при введении НИПМГ и ДКБ в той же дозе соответственно (рис. 6).

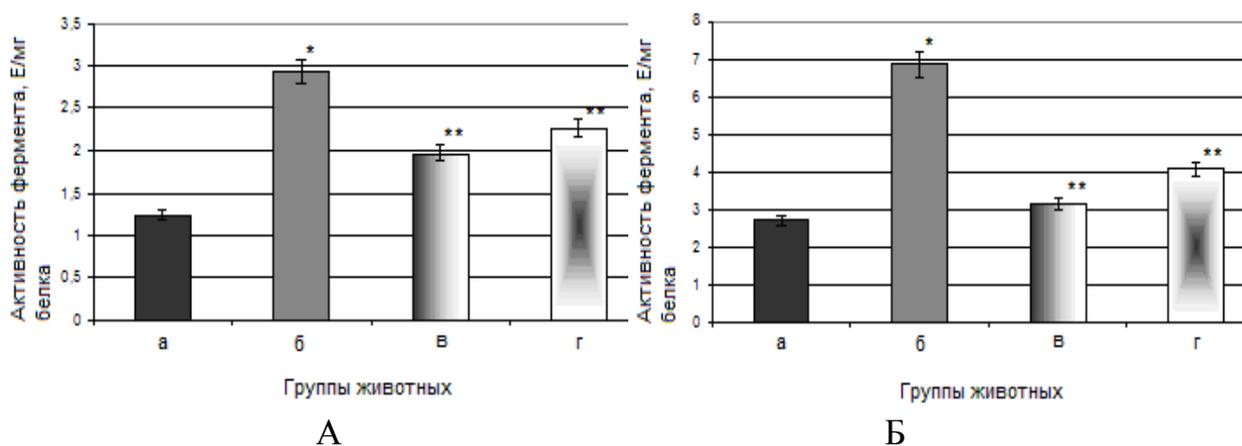


Рис. 5. Удельная активность супероксиддисмутазы в печени (А) и сердце (Б) крыс контрольной группы (а), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (б), при введении в дозе 15 мг/кг НИПМГ (в) и ДКБ (г) животным с патологией

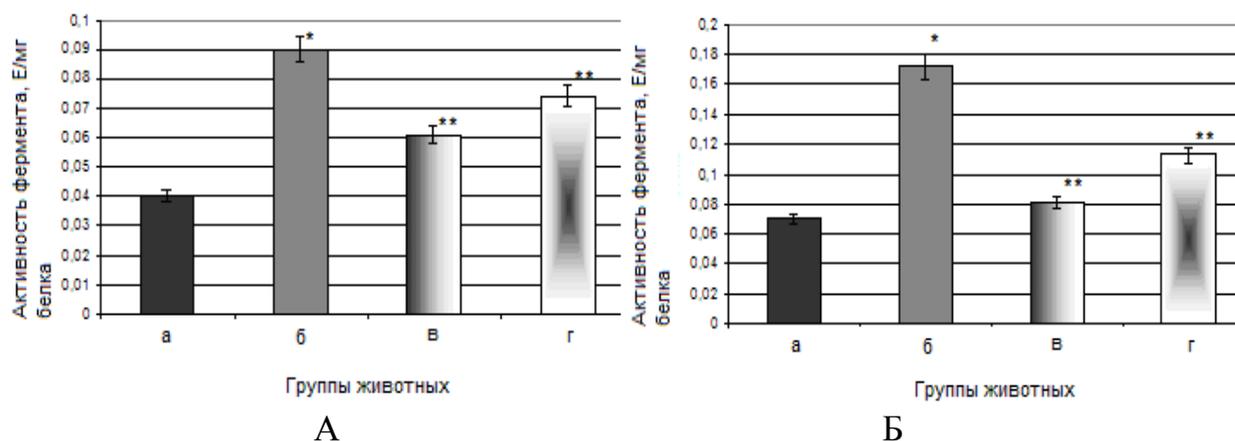


Рис. 6. Удельная активность каталазы в печени (А) и сердце (Б) крыс контрольной группы (а), крыс с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином (б), при введении в дозе 15 мг/кг НИПМГ (в) и ДКБ (г) животным с патологией.

Исходя из результатов, полученных в ходе определения активности ферментов первой линии защиты от свободных радикалов при введении НИПМГ и ДКБ животным с гипергликемией, можно сделать вывод о проявлении ими антиоксидантных свойств, что способствует снижению степени образования активных форм кислорода (АФК), и, как следствие, нормализации работы АОС. По-видимому, данные соединения можно рассматривать как антиоксиданты прямого действия (Зайцев В.Г., 2003) 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.

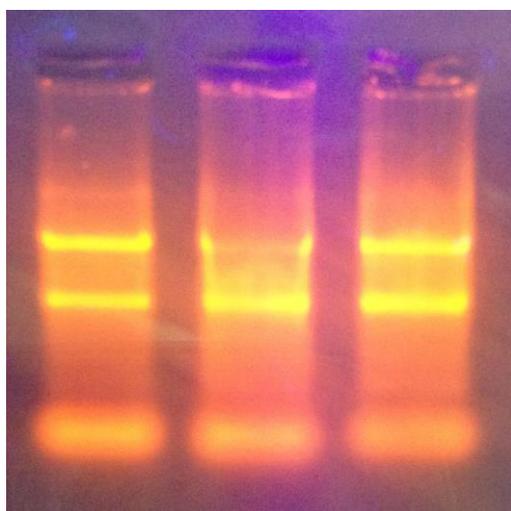
Результаты проведенных исследований показали, что при введении бигуанидиновых производных крысам с гипергликемией наблюдается возрастание содержания GSH, уменьшение которого отмечено при развитии патологии. Вместе с тем, при введении НИПМГ и ДКБ во всех испытуемых дозах крысам с гипергликемией, индуцированной как протамин-сульфатом, так и стрептозоцином, 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. Так, при использовании НИПМГ в качестве протектора в дозе 15 мг/кг 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.

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 (Ouslimani N., 2005).

УРОВЕНЬ ТРАНСКРИПТОВ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ БИГУАНИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ФОНЕ РАЗВИТИЯ ПАТОЛОГИИ

С целью оценки уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов 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. 7). Качество РНК оставалось постоянным во всех группах в пределах одного органа и незначительно различалось для различных органов. На следующей стадии в ходе обратной транскрипции была получена библиотека кДНК экспрессирующихся генов *Sod1*, *Cat*, *Gpx* и *Gsr*, 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.

В ходе анализа уровня транскриптов генов, кодирующих СОД1, каталазу, ГП1 и ГР, установлено, что введение НИПМГ и ДКБ приводит к снижению уровня транскриптов генов указанных антиоксидантных ферментов, возрастающего при гипергликемии. Так, при действии НИПМГ в дозе 15 мг/кг на фоне гипергликемии, индуцированной стрептозоцином, относительный уровень транскриптов генов *Sod1* и *Cat* снижался в печени в 1,4 и 1,6 раза, в почках в 1,2 и 2,1 раза, в сердце в 1,5 и 2,0 раза. При этом уровень транскриптов генов *Gpx1* и *Gsr* уменьшался в 1,7 и 1,8 раза в печени, в 1,7 и 2,5 раза в почках, в 1,5 раза в сердце относительно уровня при гипергликемии (табл. 3).



печень почки сердце
Рис. 7. Электрофореграмма
тотальной РНК из тканей крыс

Известно, что гены СОД имеют в области промотора сайт связывания для редокс-чувствительного транскрипционного ядерного фактора NF-κB (Tomas-Zapico С., 2005), 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 ОхуR (Николайчик Е.А., 2007). Активация данного белка под действием пероксида водорода стимулирует синтез порядка 30 ферментов, в том числе и ГР.

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.

Изменение уровня транскриптов генов СОД, каталазы, ГП и ГР в печени крыс при гипергликемии и действии бигуанидиновых производных

Группы животных	$2^{-\Delta\Delta Ct} (Sod1)$	$2^{-\Delta\Delta Ct} (Cat)$	$2^{-\Delta\Delta Ct} (Gpx1)$	$2^{-\Delta\Delta Ct} (Gsr)$
Контроль	1,00	1,00	1,00	1,00
Гипергликемия, индуцированная протамин-сульфатом	2,10±0,11*	2,54±0,13*	3,85±0,19*	2,19±0,11*
Введение НИПМГ (15 мг/кг)	1,21±0,06**	1,38±0,07**	1,78±0,09**	1,16±0,06**
Введение ДКБ (15 мг/кг)	1,74±0,09**	1,60±0,08**	2,51±0,13**	1,45±0,07**
Гипергликемия, индуцированная стрептозоцином	3,18±0,16*	1,79±0,09*	1,85±0,09*	2,04±0,10*
Введение НИПМГ (15 мг/кг)	2,21±0,11***	1,14±0,06***	1,08±0,05***	1,14±0,06***
Введение ДКБ (15 мг/кг)	2,52±0,13***	1,36±0,07***	1,23±0,06***	1,41±0,07***

Примечание: различия достоверны при $p < 0,05$: * - относительно контроля, взятого за 100%, ** - относительно гипергликемии, индуцированной протамин-сульфатом, *** - относительно гипергликемии, индуцированной стрептозоцином

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ВВЕДЕНИИ БИГУАНИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ЖИВОТНЫМ С ГИПЕРГЛИКЕМИЕЙ

Нормальное функционирование глутатионовой АОС сопряжено с постоянным поступлением в систему восстановительных эквивалентов. В этой связи была произведена оценка изменений активностей НАДФ-ИДГ и Г6ФДГ при введении НИПМГ, ДКБ и препарата сравнения животным с гипергликемией. Отмечено, что при действии метформина, НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг на фоне гипергликемии, индуцированной протамин-сульфатом, удельная активность НАДФ-ИДГ, возрастающая при развитии патологии, 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% (рис. 8А). Подобные изменения удельной активности НАДФ-ИДГ были выявлены и при введении бигуанидиновых производных животным с патологией, вызванной действием стрептозоцина.

Установлено, что развитие гипергликемии сопровождается уменьшением активности Г6ФДГ. Вероятно, это может быть сопряжено с торможением интенсивности пентозофосфатного пути, что связано с перераспределением глюкозо-6-фосфата между различными путями метаболизма углеводов (McLennan S.V., 1991). 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 (Carette C., 2011)

или даже способствовать β -клеточному апоптозу (Zhang Z., 2009). Введение НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг на фоне гипергликемии, индуцированной протамин-сульфатом, способствовало увеличению удельной активности Г6ФДГ в печени крыс в 1,3 и 1,2 раза, в почках в 1,3 и в первом, и во втором случае, в сыворотке крови в 1,6 и 1,3 раза, в сердце в 1,2 раза (рис. 8Б). Введение в той же дозе препарата сравнения приводило к увеличению удельной активности Г6ФДГ в печени, почках и сердце в 1,2 раза, в сыворотке крови крыс – в 1,3 раза. Изменения активности Г6ФДГ, выраженной в Е/г сырой массы тканей и в Е/мл сыворотки крови, при введении бигуанидиновых производных на фоне протамин-сульфатной модели гипергликемии имели сходный характер. Наряду с этим, отмечено также возрастание активности Г6ФДГ при введении НИПМГ и ДКБ при развитии гипергликемии, индуцированной стрептозоцином.

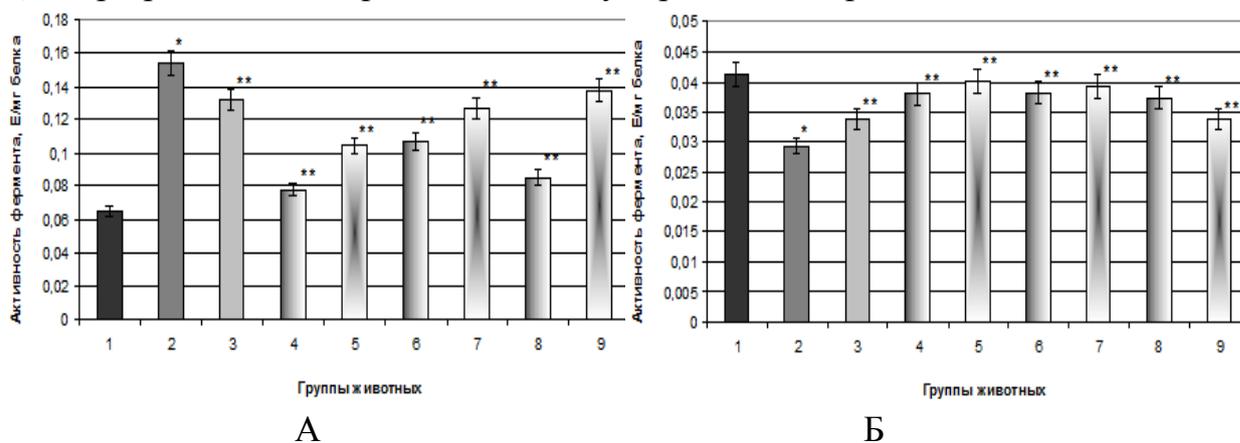


Рис. 8. Удельная активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (А) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Б) в почках крыс контрольной группы (1), крыс с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом (2), при введении крысам с патологией в дозе 15 мг/кг метформина (3), в дозе 10 мг/кг НИПМГ (4) и ДКБ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

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 (Матасова Л.В., 2008). Введение ДКБ в дозах 10 и 15 мг/кг животным с гипергликемией, индуцированной протамин-сульфатом, 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. 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. При введении НИПМГ и ДКБ в дозе 15 мг/кг животным с гипергликемией, индуцированной стрептозоцином, 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.

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.

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 активных форм кислорода, 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.

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 была выявлена мобилизация компонентов АОС. При введении бигуанидиновых производных происходило 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.

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. 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. 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.

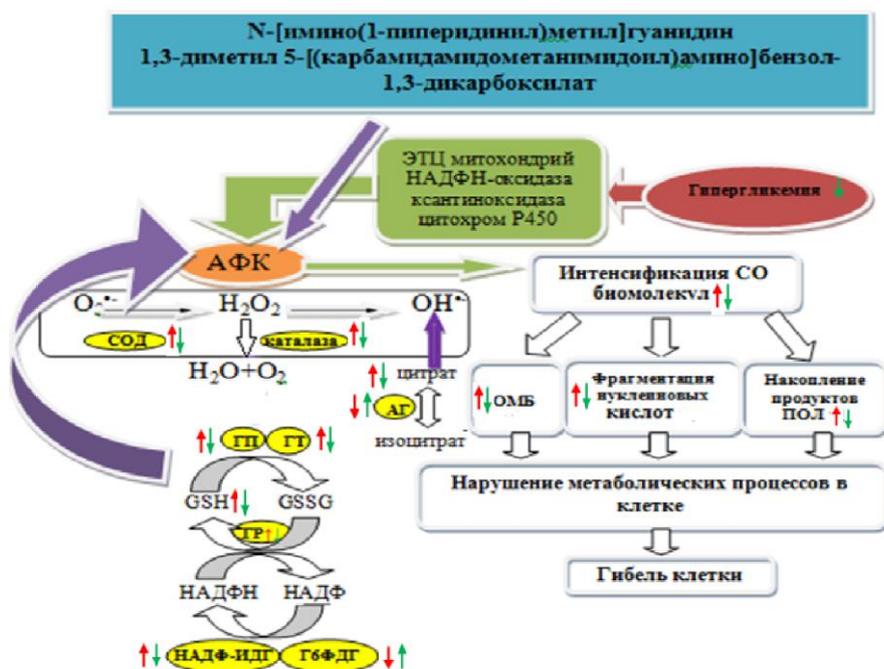
Функционирование глутатионовой АОС сопряжено с постоянным поступлением в систему восстановительных эквивалентов, генерирование которых осуществляют ферменты НАДФ-ИДГ и Г6ФДГ. В ходе экспериментальных исследований было показано, что введение бигуанидиновых производных приводило к снижению активности НАДФ-ИДГ, 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. 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 ферментов окислительного метаболизма, в частности, НАДФН-генерирующих ферментов.

Таким образом, 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. 9). 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 степени выраженности окислительного стресса. Под воздействием свободных радикалов происходила интенсификация процессов СО биомолекул, в частности ПОЛ, ОМБ и фрагментации 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.



Условные обозначения:
 ↑↓ - изменение параметра при гипергликемии;
 ↑↓ - изменение параметра при введении бигуанидиновых производных крысам с гипергликемией;
 ➔ - антиоксидантный эффект.

Рис. 9. Гипотетическая схема воздействия бигуанидиновых производных НИПМГ и ДКБ на антиоксидантный статус при гипергликемии в эксперименте на животных

ВЫВОДЫ

1. Введение N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина (НИПМГ) и 1,3-диметил 5- [(карбамимидамидометанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата (ДКБ) во всех исследуемых дозах (10, 15 и 25 мг/кг) приводило к снижению концентрации глюкозы в сыворотке крови крыс, возрастающей при патологии, вызванной с помощью протаминсульфатной и стрептозоциновой моделей гипергликемии. Эффекты НИПМГ, ДКБ и препарата сравнения (метформин) имели сопоставимый характер. Так, НИПМГ в дозе 10 мг/кг, также как и 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 ДК, степени окислительной модификации белков и параметров биохемилюминесценции – 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 $tg\alpha_2$, 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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1. Агарков А.А. Оценка степени фрагментации ДНК, активности аконитатгидратазы и уровня цитрата при сахарном диабете 2 типа у крыс и введении мелатонина / А.А. Агарков, Т.Н. Попова, Л.В. Матасова, С.С. Попов, И.Ю. Искусных, **Е.И. Склярова** // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2012. – №3. – С. 21-26.

2. Склярова Е.И. Влияние N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина на интенсивность свободнорадикальных процессов, активность аконитатгидратазы и содержание цитрата в тканях крыс при экспериментальном сахарном диабете 2 типа / **Е.И. Склярова**, Т.Н. Попова, К.К. Шульгин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 161, №2. – С. 222-226.

3. Влияние N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина на интенсивность свободнорадикальных процессов и активность некоторых антиоксидантных ферментов в почках крыс при экспериментальном сахарном диабете 2 типа / **Е.И. Склярова**, Т.Н. Попова, К.К. Шульгин, В.В. Спицина, Д.В. Крыльский, А.В. Семенихина // Химико-фармацевтический журнал. – 2018. – Т. 52, №3. – С. 3-6.

4. Воздействие бигуанидиновых производных на развитие оксидативного стресса при гипергликемии у крыс / **Е.И. Горина**, Т.Н. Попова, К.К. Шульгин, С.С. Попов, Л.Ф. Панченко, О.А. Сафонова // Биомедицинская химия. – 2018. – Т. 64, №3. – С. 261-267.

5. Активность супероксиддисмутазы в тканях крыс при сахарном диабете 2 типа и действии N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина / **Е.И. Склярова**, Т.Н. Попова, К.К. Шульгин // Материалы XX международной научно-практической конференции «Актуальные достижения науки», 2014г.: тез. докл. – Прага, 2014. – С. 31-33.

6. Активность каталазы в тканях крыс при сахарном диабете 2 типа и действии N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина / Т.Н. Попова, **Е.И. Склярова**, К.К. Шульгин // Материалы VIII международной научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований», 25 июля 2014г.: тез. докл. – Москва, 2014. – С. 154-155.

7. Воздействие N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина на активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в сыворотке крови крыс с гипергликемией, вызванной введением протаминсульфата / **Е.И. Склярова**, Т.Н. Попова, К.К. Шульгин, В.В. Спицина, Х.Н. Нууле // Сборник материалов VII международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной науки в 21 веке», 26 апреля, 2015г.: тез. докл. – Махачкала, 2015. – С. 25-27.

8. Содержание диеновых конъюгатов в сыворотке крови крыс при развитии сахарного диабета 2 типа и действии бигуанидиновых производных / **Е.И. Склярова**, Т.Н. Попова, К.К. Шульгин, Е.И. Гончарова // Материалы

международной научно-практической конференции, посвященной «Университетская наука: взгляд в будущее», 4-6 февраля 2016г.: тез. докл. – Курск, 2016. – С. 75-78.

9. Параметры биохемилюминесценции в тканях крыс при экспериментальном сахарном диабете 2 типа и введении N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина / **Е.И. Склярова**, Т.Н. Попова, К.К. Шульгин // Сборник статей студентов, магистрантов, аспирантов, молодых ученых и преподавателей. «Актуальные вопросы развития территорий: теоретические и прикладные аспекты», № 2, 7 марта 2016г.: тез. докл. – Пермь, 2016. – С. 119-121.

10. Влияние N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина на активность аконитатгидратазы и содержание цитрата в тканях крыс при экспериментальном сахарном диабете 2 типа / **Е.И. Склярова**, Т.Н. Попова, К.К. Шульгин, О.А. Сафонова, Е.И. Гончарова, У.Н. Фоминова // Материалы 6-й международной научно-методической конференции «Фармобразование-2016» Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ, 21-23 апреля 2016г.: тез. докл. – Воронеж, 2016. – С. 515-519.

11. Содержание восстановленного глутатиона в тканях крыс при сахарном диабете 2 типа и введении 1,3-диметил 5-[(карбамимидамометанимидоил)амино]бензол-1,3-дикарбоксилата / **Е.И. Склярова**, Т.Н. Попова, К.К. Шульгин, В.В. Спицина // Вестник современных исследований, №1-1(4), январь 2017г.: тез. докл. – Омск, 2017. – С. 14-19.

12. Степень окислительной модификации белков в тканях крыс при сахарном диабете 2 типа / **Е.И. Склярова**, Т.Н. Попова, К.К. Шульгин, В.В. Спицина // Вестник современных исследований, №4-1(7), апрель 2017г.: тез. докл. – Омск, 2017. – С. 12-15.

13. Воздействие бигуанидиновых производных на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и НАДФ-изоцитратдегидрогеназы в тканях крыс при гипергликемии / **Е.И. Склярова**, Т.Н. Попова, К.К. Шульгин, И.В. Белявская, Д.А. Давыдова, Е.А. Морозова // Вестник современных исследований, №11-1(14), ноябрь 2017г.: тез. докл. – Омск, 2017. – С. 34-36.

14. Анализ уровня транскриптов генов антиоксидантных ферментов в тканях крыс с гипергликемией на фоне введения бигуанидиновых производных / **Е.И. Горина**, Т.Н. Попова, К.К. Шульгин, О.А. Сафонова // Материалы XV международной научно-практической конференции «Наука и образование: сохраняя прошлое, создаём будущее», 5 мая 2018г.: тез. докл. – Пенза, 2018. – С. 35-37.

Публикации 1-4 опубликованы в печатных изданиях, состоящих в списке журналов, рекомендованных ВАК РФ, а также входящих в базы цитирований Web of Science (2,3) и Scopus (4).