

# Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-3-3-6  
© Коллектив авторов, 2018

Е. И. Склярова, Т. Н. Попова, К. К. Шульгин, В. В. Спицина,  
Д. В. Крыльский\*, А. В. Семенихина

## 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

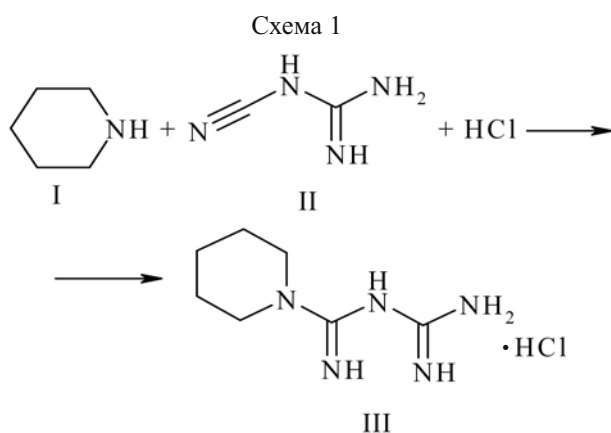
Воронежский государственный университет, Россия, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1;  
e-mail: kattilda@mail.ru

\* Центр высоких технологий ФГУП "Научно-исследовательский институт прикладной акустики", Россия, 141981, Московская область, Дубна-1, ул. 9 Мая, д. 7А

Целью настоящей работы явилось исследование влияния синтетического производного бигуанида N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина на интенсивность свободнорадикальных процессов, уровень диеновых конъюгатов, активность супероксиддисмутазы и каталазы в почках крыс при экспериментальном сахарном диабете 2 типа (СД2). Показано, что введение данного вещества крысам с СД2 способствовало изменению в сторону нормы исследуемых параметров, что может быть связано с его способностью оказывать позитивное регулирующее воздействие на свободнорадикальный гомеостаз.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 2 типа; свободнорадикальные процессы; антиоксидантные ферменты; бигуаниды.

В настоящее время актуальной задачей является разработка новых подходов в терапии сахарного диабета 2 типа (СД2), включающих применение препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами. В данной работе проводилось исследование N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина (НИПМГ) — синтетического производного бигуанида (рис.1), которое было отобрано согласно целевой биологической активности с помощью программы прогноза "структура — свойство" PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), доступной в режиме on-line по адресу: <http://www.ibmh.msk.su/pass> [1, 2].

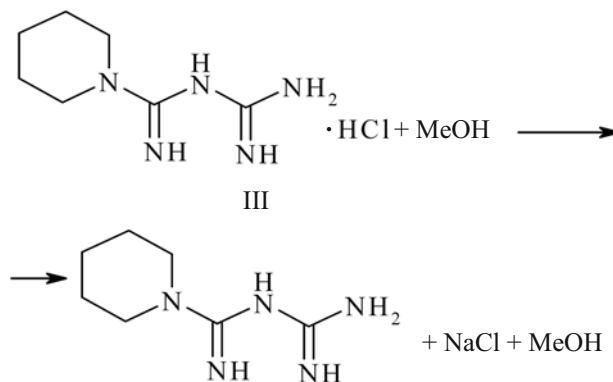


Методика синтеза НИПМГ основана на реакции пиперидина (I) с дициандиамидом (II) в спиртовом рас-

творе в присутствии соляной кислоты (схема 1). Получаемый гидрохлорид бигуанида III переводят в свободное основание действием метилата натрия (схема 2, табл. 1, 2).

Целью настоящей работы явилось исследование влияния НИПМГ на интенсивность свободнорадикальных процессов (СРП), уровень диеновых конъюгатов (ДК), активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1.) и каталазы (КФ 1.11.1.6) в почках крыс при экспериментальном СД2.

Схема 2



### Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использовались самцы белых лабораторных крыс массой 150 – 200 г, содержащиеся в стандартных условиях вивария. В

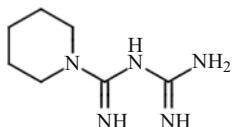


Рис. 1. Структура N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина.

ходе эксперимента животные были разделены на 4 группы: 1-я группа ( $n = 20$ ) — контрольные животные; 2-я группа ( $n = 20$ ) — животные, которым внутримышечно вводили протамин-сульфат (Sigma, США) в течение 3 недель в дозе 10 мг/кг массы тела в объеме 0,5 мл 0,9 % раствора NaCl, 3 раза в сутки [3]; 3-я группа ( $n = 20$ ) — животные с гипергликемией, которым внутривенно вводили препарат сравнения метформин в виде раствора в 0,5 мл 0,9 % раствора NaCl в дозе 10 мг/кг, утром ежедневно на последней неделе эксперимента 1 раз в сутки; и животным 4-й группы ( $n = 20$ ) по той же схеме вводили НИПМГ в дозе 10 мг/кг массы. Через 3 недели после начала индукции СД2 наркотизированных животных всех экспериментальных групп умерщвляли и использовали для дальнейших исследований.

При выборе доз НИПМГ руководствовались средними рекомендуемыми терапевтическими дозами метформина (перорального сахароснижающего препарата бигуанидинового ряда) для людей в пересчете на массу животного.

Выбор для исследования почечной ткани связан с ее высокой подверженностью повреждениям в патогенезе СД2.

Для извлечения почек крысам под наркозом производили лапаротомию, затем перфузировали почки ледяным изотоническим раствором со скоростью 5 мл/мин в течение 5 мин. Навеску ткани гомогенизировали с помощью гомогенизатора в 3,5-кратном объеме охлажденной среды выделения. Среда имела следующий состав: 0,05 М *трис*-НСI-буфер (рН 7,8), содержащий 1 мМ ЭДТА, 1 %  $\beta$ -меркаптоэтанол. Гомогенат центрифугировали при 7500 g в течение 12 мин. Супернатант использовали для исследования.

Интенсивность СРП определяли с помощью метода хемилюминесценции (ХЛ), индуцированной перекисью водорода и сульфатом железа, на хемилюминиметре БХЛ-07 с программным обеспечением (Medozons, Россия). Кинетическую кривую ХЛ регистрировали в течение 30 с и определяли следующие параметры: светосумму хемилюминесценции ( $S$ ), интенсивность вспышки ( $I_{\max}$ ), характеризующие интенсивность СРП, и величину тангенса угла наклона кривой ( $\text{tg}\alpha_2$ ), отражающую общую антиоксидантную ак-

тивность [4]. Содержание ДК определяли спектрофотометрически при 233 нм [5].

Активность ферментов измеряли при длине волны 540 нм (для СОД) и 410 нм (для каталазы) на спектрофотометре Hitachi U-1900 [6]. Общий белок определяли биуретовым методом [6]. Уровень гликемии в сыворотке крови крыс определяли на 15, 17 и 19 сут с начала введения протамин-сульфата глюкозооксидазным методом с помощью набора реактивов “ГЛЮКОЗА-12-ВИТАЛ”, ООО “Витал-Диагностикс”, Санкт-Петербург, Россия.

Данные обрабатывали с использованием *t*-критерия Стьюдента, различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . В ходе работы использовали NADPH, ЭДТА (“Sigma”, США), остальные реактивы отечественного производства марки х.ч. или ч.д.а.

### Результаты и их обсуждение

В наших исследованиях мы использовали протамин-сульфатную модель индуцирования СД2, которая основана на возможности связывания протамин-сульфатом эндогенного гепарина у крыс, что ведет к развитию резистентности по отношению к гипогликемическому действию как эндогенного, так и экзогенного инсулина [3].

Было выявлено прогрессирующее увеличение содержания глюкозы в сыворотке крови животных, которым вводили протамин-сульфат. Так, концентрация глюкозы через 3 недели после начала введения протамин-сульфата возросла в 3,2 раза, по сравнению с ее уровнем у контрольных животных. Введение препарата сравнения крысам с СД2 приводило к снижению уровня гликемии в 2,6 раза, а введение НИПМГ — в 2,5 раза по сравнению с патологией. Можно предположить, что наблюдаемый гипогликемический эффект НИПМГ связан со способностью бигуанидов повышать чувствительность к инсулину периферических тканей (преимущественно поперечно-полосатой мускулатуры, в меньшей степени — жировой ткани) [7]. Так же как и другие бигуанидиновые производные, НИПМГ, видимо, может усиливать связывание инсулина с рецепторами в разных тканях — эритроцитах, моноцитах, гепатоцитах, адипоцитах, миоцитах. Это обусловлено, в первую очередь, нормализацией активности тирозинкиназы инсулинового рецептора, а также улучшением транспорта глюкозы белками-переносчиками GLUT-1, локализующимися в плазматической мембране, и GLUT-4, расположенными преимущественно во внутриклеточных мембранах [8].

В результате проведенных исследований установлено, что при развитии СД2 наблюдается дисбаланс в рав-

Таблица 1

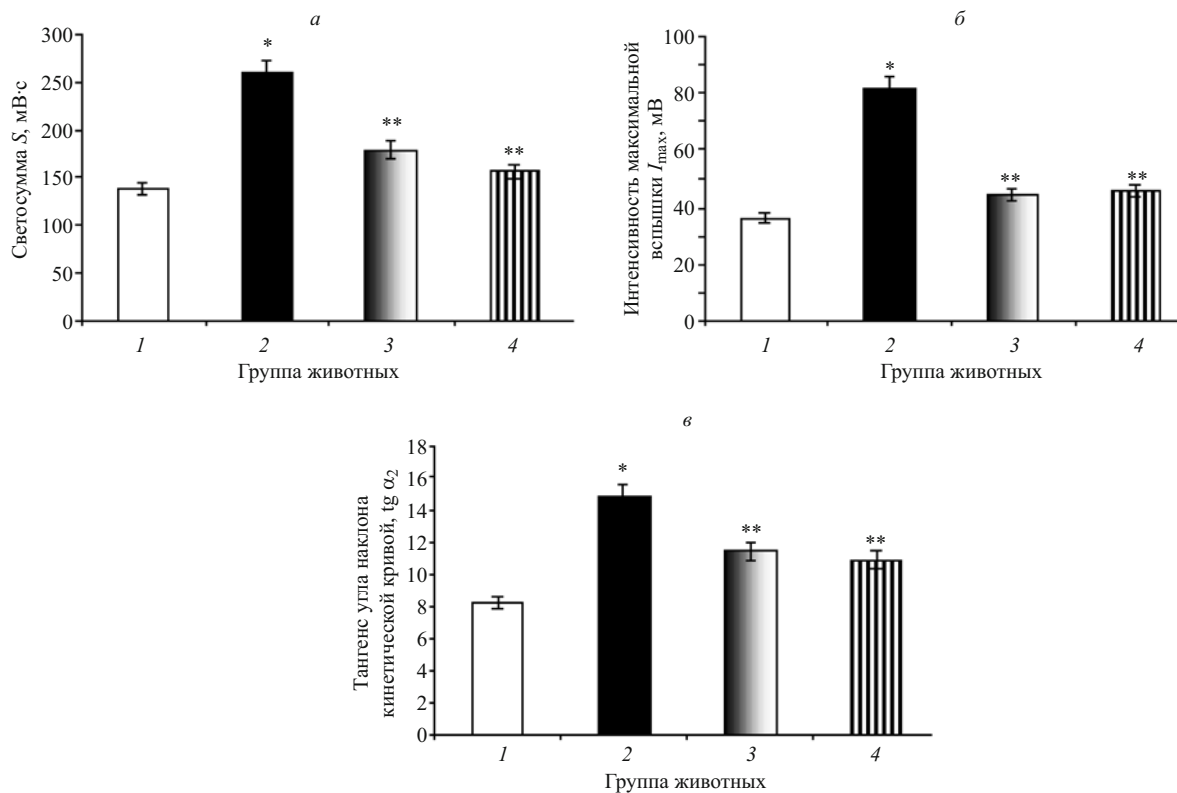
#### Характеристика синтезированного бигуанида

Соединение	Брутто-формула	$T_{\text{пл}}$ , °С	Выход, %
НИПМГ	$C_7H_{15}N_5$	184 – 185	52

Таблица 2

#### Данные спектров ЯМР $^1H$ синтезированного соединения

Соединение	Химический сдвиг $\delta$ , 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)



**Рис. 2.** Параметры хемилюминесценции:  $S$  (а),  $I_{\max}$  (б) и  $\text{tg}\alpha_2$  (в) у крыс в норме (1), при СД2 (2), при введении препарата сравнения (3) и при введении N-[имино(1-пиперидинил)метил]гуанидина (4) на фоне СД2. Различия достоверны при  $p \leq 0,05$ : (\*) — по сравнению с контрольной группой, (\*\*) — по сравнению с СД2.

боте антиоксидантной системы, который сопровождается значительным повышением интенсивности свободнорадикального окисления и развитием окислительного стресса, что проявлялось в повышении параметров ХЛ. Введение НИПМГ экспериментальным животным приводило к существенному изменению исследуемых параметров. Так, нами выявлено изменение в сторону нормы параметра  $S$  в почках крыс в 1,7 раза (рис. 2, а); параметра  $I_{\max}$  — в 1,8 раза (рис. 2, б); параметра  $\text{tg}\alpha_2$  — в 1,4 раза (рис. 2, в). Схожая тенденция наблюдалась и при введении крысам с СД2 препарата сравнения: параметр  $S$  снижился в сторону нормы в 1,5 раза,  $I_{\max}$  — в 1,8 раза и  $\text{tg}\alpha_2$  — в 1,3 раза.

В ходе исследования также установлено, что при введении как препарата сравнения, так и НИПМГ удельная активность СОД, повышенная в условиях развития СД2, снижалась в почках крыс в 1,3 раза, изменяясь в сторону контрольных значений (табл. 3). Из литературных источников известно, что метформин

способен ингибировать 1 комплекс электронтранспортной цепи митохондрий и связанную с ним генерацию АФК [9]. Кроме того, метформин способен ингибировать NADPH-оксидазу, работа которой сопряжена с образованием супероксидного анион-радикала [10]. В этой связи можно предполагать, что НИПМГ также может оказывать антиоксидантный эффект, в основе которого могут лежать подобные механизмы действия. Изменение активности СОД в сторону контрольных значений при введении НИПМГ, видимо, обусловлено снижением уровня супероксидного анион-радикала в результате реализации антиоксидантного действия данного бигуанида. Также имеются данные об уменьшении скорости синтеза СОД в клетке *de novo* при снижении интенсивности окислительного стресса [11].

В ходе наших исследований установлено, что при введении НИПМГ крысам с СД2 удельная активность каталазы в почках уменьшается в 1,4 раза, при введении препарата сравнения — в 1,3 раза по сравнению с

Таблица 3

**Активность ферментов антиоксидантной системы и содержание ДК в почках крыс разных экспериментальных групп**

Группа животных	СОД, Е/мг белка	Каталаза, Е/мг белка	ДК, мкмоль/г ткани
Норма	0,9955 ± 0,0498	0,0126 ± 0,0006	9,59 ± 0,48
СД2	1,3937 ± 0,0697	0,0277 ± 0,0014	21,13 ± 1,06
СД2 + метформин	1,0454 ± 0,0523	0,011 ± 0,0011	15,15 ± 0,76
СД2 + НИПМГ	1,0451 ± 0,0523	0,0195 ± 0,0010	11,31 ± 0,57

патологией (табл. 3). Согласно имеющимся литературным данным, существует взаимосвязь между интенсивностью NADPH-зависимого перекисного окисления липидов (ПОЛ) и активностью каталазы [12]. Причем при совместном добавлении каталазы и СОД имеет место наиболее выраженный эффект на скорость ПОЛ [12]. В этой связи следует отметить, что уровень ДК — первичных продуктов ПОЛ, значительно возрастающий в условиях индуцирования СД2, при введении НИПМГ крысам с патологией снижался в почках в 1,9 раза, а при введении препарата сравнения — в 1,4 раза, приближаясь к контрольным значениям (табл. 3).

Таким образом, введение НИПМГ крысам с СД2 способствовало изменению активности СОД и каталазы в сторону нормы, что может быть связано с его способностью оказывать позитивное регулирующее воздействие на свободнорадикальный гомеостаз, которое осуществляется через ингибирование процессов свободнорадикального окисления — одного из ключевых патогенетических факторов развития СД. По-видимому, данное соединение можно рассматривать как антиоксидант прямого действия из-за наличия в его структуре бигуанидного фрагмента и пиперидинового гетероцикла, проявляющего электронно-донорные свойства, что обеспечивает возможность смещения электронной плотности в сторону бигуанидного фрагмента, ответственного за взаимодействие со свободными радикалами.

Полученные нами данные углубляют представления о бигуанидиновых производных как о веществах, обладающих антиоксидантными свойствами, и могут быть использованы для дальнейших доклинических и

клинических исследований с целью расширения спектра препаратов для лечения больных СД2, а также повышения эффективности терапии данной патологии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Садым, А. А. Лагунин, Д. А. Филимонов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **36**(10), 21 – 26 (2002); *Pharm. Chem. J.*, **36**(10), 538 – 543 (2002).
2. V. V. Poroikov, and D. A. Filimonov, and C. Helma (ed.), *Predictive Toxicology*, Taylor & Francis, New York (2005), pp. 459 – 478.
3. А. М. Ульянов, Ю. А. Тарасов, *Вопросы мед. химии*, **46**(2), 149 – 154 (2000).
4. В. С. Бузлама, *Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и систем антиоксидантной защиты у животных*, Изд-во ВГУ, Воронеж (1997), с. 41.
5. И. Д. Стальная, *Современные методы в биохимии*, Медицина, Москва (1977), с. 18.
6. Т. И. Рахманова, Л. В. Матасова, А. В. Семенихина и др., *Методы оценки оксидативного статуса: учебно-методическое пособие для вузов*, Изд-во ВГУ, Воронеж (2009), сс. 35 – 37.
7. О. М. Смирнова, *Сахарный диабет*, № 3, 45 – 46 (2010).
8. М. И. Balabolkin, and V. M. Kreminskaya, and E. M. Klebanova, *Consilium Med.*, **3**(11), 154 – 156 (2001).
9. M. R. Owen, and E. Doran, and A. P. Halestrap, *Biochem J.*, No. 3, 607 – 614 (2000).
10. N. Ouslimani, and J. Peynet, and D. Bonnefont-Rousselot, et al., *Metabolism*, **54**(6), 829 – 834 (2005).
11. B. K. Tiwari, K. B. Pandey, A. B. Abidi, et al., *J. Biomark*, **2013**, Article ID 378790, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/378790> (2013).
12. Е. Б. Меньшикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков и др., *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты*, Слово, Москва (2006), с. 553.

Поступила 28.10.15

## EFFECT OF N-[IMINO(1-PIPERIDINYL)METHYL]GUANIDINE ON THE INTENSITY OF FREE RADICAL PROCESSES AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SOME ENZYMES IN KIDNEYS OF RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS TYPE 2

E. I. Sklyarova<sup>1\*</sup>, T. N. Popova<sup>1</sup>, K. K. Shul'gin<sup>1</sup>, V. V. Spitsyna<sup>1</sup>, D. V. Kryl'skii<sup>2</sup>, and A. V. Semenikhina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Voronezh State University, Voronezh, 394006 Russia

<sup>2</sup> Center for High Technology, Scientific Research Institute of Applied Acoustics, Dubna-1, Moscow oblast, 141981 Russia;

\* e-mail: kattilda@mail.ru

This work was aimed at study the effect of synthetic biguanide derivative N-[imino (1-piperidinyl)methyl]guanidine on the intensity of free-radical processes, the level of diene conjugates, and the activity of superoxide dismutase and catalase in the kidneys of rats with experimental type 2 diabetes mellitus (T2DM). It is established that the introduction of this substance in rats with T2DM contributes to normalization of the parameters studied, which may be due to its ability to produce a positive regulating effect on the free radical homeostasis.

**Keywords:** type 2 diabetes mellitus, free-radical processes, antioxidant enzymes, biguanides.