

Рекомендована д-м біол. наук, проф. І.М. Кліщем

УДК 615.252.349:616.379-008.64

## АНТИДІАБЕТОГЕННИЙ ЕФЕКТ ПОХІДНОГО СУКЦИНАНІЛОВОЇ КИСЛОТИ ЗА УМОВ АБСОЛЮТНОЇ ІНСУЛІНОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ АВТОІМУННОГО ГЕНЕЗУ

© О.М. Кириченко, <sup>1</sup>В.В. Полторак

Національний фармацевтичний університет, Харків

<sup>1</sup>Інститут проблем ендокринної патології імені В.Я. Данилевського АМН України, Харків

**Резюме:** вивчено вплив профілактичного введення фенілетиламіду сукцинанілової кислоти на розвиток абсолютної інсулінової недостатності автоімунного генезу (модель низькодозового стрептозотоцинового діабету у мишей). Встановлено, що застосування сполуки сприяє поліпшенню глюкозного гомеостазу і зниженню ступеня лімфоцитарної інфільтрації в панкреатичних острівцях експериментальних тварин.

**Ключові слова:** цукровий діабет 1 типу, фенілетиламід сукцинанілової кислоти, антидіабетогенні властивості.

**Вступ.** Цукровий діабет I типу (інсулінозалежний) є хронічною хворобою, яка пов'язана з високим ризиком інвалідизації та потребує значних соціальних витрат, оскільки 50 % хворих складають діти [8]. Він належить до автоімунних захворювань, що характеризується поступовим руйнуванням бета-клітин підшлункової залози з наступним розвитком абсолютної недостатності інсуліну. Зрозуміло, що в клінічній практиці діагноз цукровий діабет 1 типу може бути встановлений лише на останній стадії хвороби, коли зруйновано понад 80 % бета-клітин і недостатність інсуліну стає явною. Численні спроби захистити бета-клітини від деструкції і тим самим запобігти розвитку самого захворювання донедавна були малоуспішними.

Однак досягнення останніх років у діабетології та імунології намітили нові технології і підходи, які дозволяють, принаймні за експериментальних умов, практично цілком пригнічувати реакції автоагресії і зберігати функціонуючий пул бета-клітин [5].

Останнім часом з'явилися повідомлення про захисну дію метилового ефіру бурштинової кислоти відносно бета-цитотоксичної агресії інтерлейкіну-1 та стрептозотоцину. Цей ефект пов'язують зі здатністю бурштинової кислоти метаболізуватися в циклі Кребса з наступним відновленням рівня АТФ, що був знижений внаслідок автоімунного та токсичного втручання [4]. Але введення метилового ефіру бурштинової кислоти може призводити до небажаного утворення токсичної речовини метанолу, що обмежує перспективність його клінічного застосування і стимулює подальший пошук ефективних і разом з тим нешкідливих сполук серед похідних бурштинової кислоти.

Раніше нами було показано, що низькотоксичне похідне бурштинової кислоти – фенілетиламід сукцинанілової кислоти (ФС), який на сьогодні проходить стадію клінічних випробувань, виявляє виразний антиоксидантний ефект та стимулює регенерацію панкреатичних бета-клітин у тварин із експериментальним цукровим діабетом [3, 7, 2]. Мета даної роботи – дослідження впливу профілактичного застосування ФС на розвиток абсолютної інсулінової недостатності автоімунного генезу у мишей.

**Методи дослідження.** Абсолютну інсулінову недостатність автоімунного генезу відтворювали внутрішньоочеревинним введенням низьких доз стрептозотоцину (СТЦ) (40 мг на кг маси тіла) самцям мишей СВА протягом 5 діб [9]. Стан глюкозного гомеостазу оцінювали через 1, 5, 8, 10, 12 та 15 діб після першої ін'єкції СТЦ, а також під час внутрішньоочеревинного тесту толерантності до глюкози (ВЧТТГ) (2 мг на кг маси тіла). Площу під глікемічними кривими (ППКг) розраховували за допомогою комп'ютерної програми «Mathlab». ФС вводили перорально в дозі 25 мг на кг маси тіла, щоденно протягом одного тижня до- та двох тижнів після першої ін'єкції СТЦ. Як препарат порівняння використовували нікотинамід (250 мг/кг маси тіла), який на сьогодні залишається єдиним клінічно апробованим препаратом для стимуляції ендогенного росту та збереження функціональної активності панкреатичних бета-клітин. Контрольна група отримували за аналогічною схемою фізіологічний розчин. Вміст глюкози в крові визначали за допомогою ферментативного аналізатора глюкози «Ексан-Г». Базальну інсулінемію оцінювали, використовуючи радіоімунологічний метод «подвійних антигін». Коефіцієнт функції панкреатичних бета-клітин (ФБК) роз-

раховували за допомогою алгоритму НОМА [10]. Гістологічний аналіз порушень морфоструктури ендокринної частини підшлункової залози експериментальних тварин проводили з використанням напівкількісного методу градації інсулітів [ 11 ]. Характеристика визначалась за допомогою чотирибальної шкали, де: (0) – норма, без ознак запалення; (1) – лімфоцитарна інфільтрація тільки в протоці; (2) – периінсуліт (лімфоцитарна інфільтрація по краях острівця); (3) – інсуліт (лімфоцитарна інфільтрація заповнює весь острівець); (4) – тяжкий інсуліт (масивна лімфоцитарна інфільтрація з порушенням острівця).

Дослідження проводилися відповідно до національних “Загальних етичних принципів експериментів на тваринах” (Україна, 2001), що відповідають положенням “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, 1985).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили методами варіаційної статистики. Для визначення характеру розподілу отриманих результатів дослідження використовували критерій Шапіро-Уїлка. У разі нормального розподілу проводили дисперсійний аналіз ANOVA, для множинного порівняння використовували критерій Н'юмана-Кайлса. У разі розподілу, яке відрізняється від нормального, використовували непараметричний метод Крускала-Уолліса та непараметричний варіант критерію Данна для

множинного порівняння [1].

**Результати й обговорення.** Антидіабетогенний ефект ФС вивчали на моделі низькодозового СТЦ діабету, яка за клінічною картиною та генезом абсолютної інсулінової недостатності подібна до цукрового діабету I типу у людини [ 6 ]. П'ятиразове введення субдіабетогенних доз СТЦ через два тижні призводить до розвитку лімфоцитарного інсуліту та аутоімунного діабету. Механізм еволюції цього патологічного процесу включає декілька основних етапів: експресія неоантигенів через порушення бета-клітин СТЦ; потік активованих макрофагів в острівець (“одноклітинний інсуліт”) посилює його пошкодження через продукцію вільних радикалів та інтерлейкінів; процесинг та презентація фрагментів бета-клітин активованими макрофагами; активація Т-хелперних клітин; лімфоцитарна інфільтрація [ 12 ]. Слід відзначити, що острівці дуже чутливі до пошкоджувальної дії вільних радикалів, тому що мають низьку активність антиоксидантних ферментів. У зв'язку з цим продукція вільних радикалів активованими макрофагами збільшує кількість пошкоджених бета-клітин, що, в свою чергу, стимулює посилення потоку макрофагів в острівець і таким чином індукує ланцюгову реакцію.

Як свідчать отримані результати, вже через вісім діб після першої ін'єкції стрептозотоцину у тварин, які отримували плацебо, достеменно підвищує базальна глікемія (рис.1) та порушується толерантність до глюкози (рис. 2) порівняно

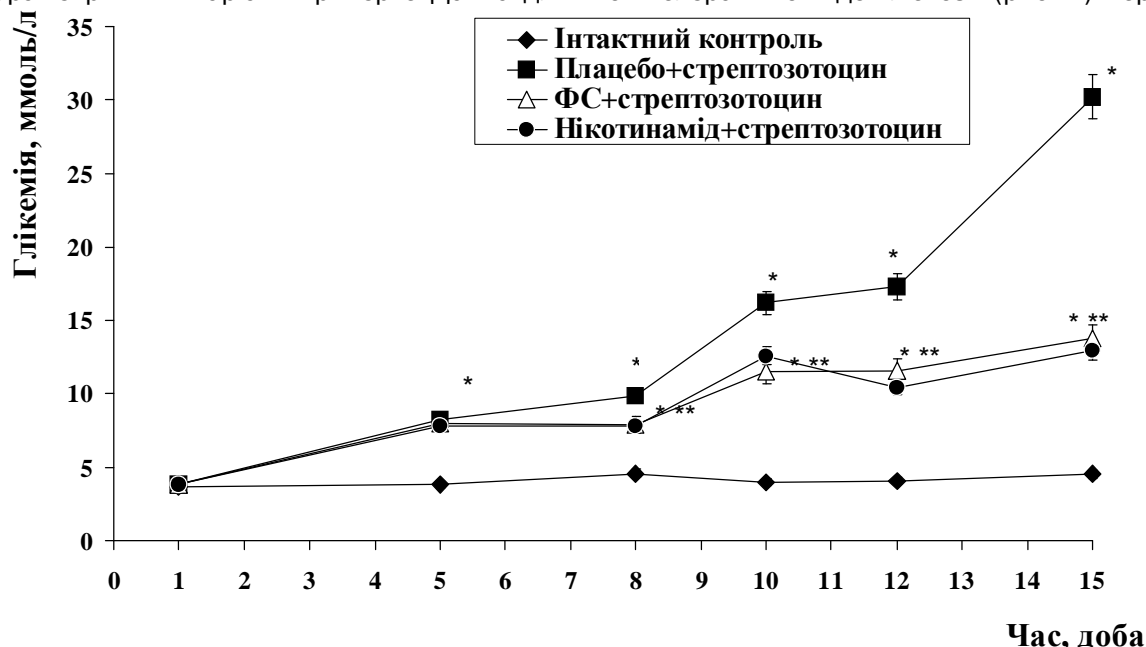


Рис. 1. Вплив ФС та нікотинаміду на динаміку глікемії у мишей СВА протягом 15 діб від початку індукції низькодозового стрептозотоцинового діабету, ( $X \pm S_x$ ),  $n=7$ .

\* – Вірогідність змін порівняно з групою “інтактний контроль”, ( $P < 0,05$ );

\*\* – вірогідність змін порівняно з групою “плацебо+стрептозотонин”, ( $P < 0,05$ ).

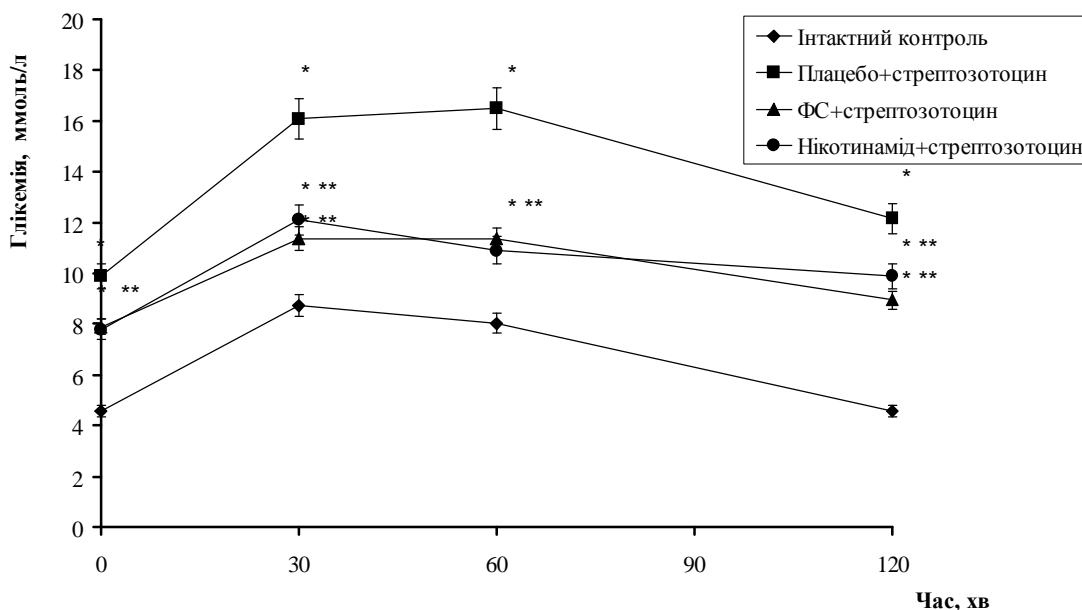


Рис. 2. Вплив ФС та нікотинаміду на динаміку глікемії під час ВЧТТГ (2 г/кг) у мишей СВА через 8 діб від початку індукції низькодозового стрептозотоцинового діабету, ( $X \pm S_x$ ),  $n=7$ .

\* – Вірогідність змін порівняно з групою “інтактний контроль”, ( $P < 0,05$ );

\*\* – вірогідність змін порівняно з групою “плацебо+стрептозотозин”, ( $P < 0,05$ ).

з інтактним контролем.

У період з 12 до 15 доби від початку індукції діабету у них продовжується стрімке зростання базальної глікемії та суттєве зниження базальної інсулінемії відносно показників в інтактній групі, що характерно для формування абсолютної інсулінової недостатності (табл. 1). Разом з тим профілактичне введення фенсукцинала запобігало розвитку інтолерантності до глюкози вже на восьму добу експерименту (див. рис. 2) та знижувало виразність базальної гіперглікемії та гіпоінсулінемії порівняно з діабетичним контролем через два тижні після першої ін'єкції стрептозотозину (див. табл. 1). Слід зазначити, що коефіцієнт

функції панкреатичних бета-клітин у тварин, які отримували фенсукцинал, в п'ять разів перевищував аналогічний показник в групі діабетичного контролю, хоча і залишався значно нижчим порівняно з мишами без діабету (див. табл.1).

На даному етапі експерименту при використанні ФС також відзначали суттєве поліпшення толерантності до вуглеводів, про що свідчили значно нижчі показники площини під глікемічними кривими при проведенні навантажувального тесту з глюкозою відносно діабетичного контролю (див. табл. 1). До того ж, за впливом на глюкозний гомеостаз ФС був подібним до препарату порівняння – нікотинаміду, який використовували в дозі,

**Таблиця 1.** Вплив ФС та нікотинаміду на показники глюкозного гомеостазу у мишей з низькодозовим стрептозотоциновим діабетом через 14 діб після першої ін'єкції стрептозотозину, ( $X \pm S_x$ )

Група тварин	Базальна глікемія, ммоль/л	Базальна інсулінемія, пмоль/л	Коефіцієнт ФБК	ППКг, ммоль/л/хв
Інтактний контроль (n=7)	4,55±0,10	82,86±8,53	264,45±36,30	830,0±10,1
Плацебо + стрептозотозин (n=7)	30,23±1,72 $P_1 < 0,001$	42,71±6,29 $P_1 < 0,01$	5,15±0,79 $P_1 < 0,001$	1744,0±82,8 $P_1 < 0,001$
ФС+ стрептозотозин (n=7)	13,76±1,64 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$ $P_3 > 0,05$	69,57±10,08 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,05$ $P_3 > 0,05$	26,15±6,28 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,01$ $P_3 > 0,05$	1239,1±39,7 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$ $P_3 > 0,05$
Нікотинамід + стрептозотозин (n=7)	13,01±0,99 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$	68,43±8,95 $P_1 > 0,05$ $P_2 < 0,05$	25,51±6,65 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,01$	1260,7±24,3 $P_1 < 0,001$ $P_2 < 0,001$

**Примітки:** 1)  $P_1$  – вірогідність змін порівняно з групою “інтактний контроль”; 2)  $P_2$  – вірогідність змін порівняно з групою “плацебо+ стрептозотозин”; 3)  $P_3$  – вірогідність змін порівняно з групою “нікотинамід+ стрептозотозин”.

що в 10 разів переважала дозу ФС.

Гістологічний аналіз ендокринної частини підшлункової залози показав (рис.3), що перинсуліти та інсуліти спостерігалися через 15 діб після першого введення СТЦ як у тих тварин, що отримували плацебо, так і у оброблених досліджуваними препаратами. Разом з тим ступінь лімфоцитарної інфільтрації в острівцях мишей, яким вводили ФС та нікотинамід, був значно нижчим порівняно з діабетичним контролем. Так, у більшості підшлункових залоз мишей, які отримували плацебо, спостерігали інсуліт, тоді як після обробки ФС та нікотинамідом спостеріга-

ли в основному перинсуліт.

**Висновки.** 1. Профілактичне введення ФС в дозі в 10 разів нижчій у порівнянні з нікотинамідом гальмує розвиток метаболічних та морфологічних проявів абсолютної інсулінової недостатності аутоімунного генезу, підтвердженням чому є поліпшення глюкозного гомеостазу та зниження виразності лімфоцитарної інфільтрації в панкреатичних острівцях експериментальних тварин.

1. Виявлені антидіабетогенні властивості ФС обґрунтовують доцільність його подальшого дослідження в якості потенційного препарату для попередження або гальмування клінічної маніфестації цукрового діабету 1 типу.

### Література

1. Гланс С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. Ю.А. Данилова. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
2. Горбенко Н.И., Полторак В.В., Гладких А.И., Иванова О.В. Влияние фенсукцинала на функциональное состояние панкреатических β-клеток у крыс с неонатально-индуцированным стрептозотоциновым диабетом // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т. 132, № 7. – С. 55-58.
3. Горбенко Н.И. Антиоксидантна активність похідного бурштинової кислоти – фенсукциалу in vitro та in vivo // Фізіологічно активні речовини. – 2002. – Т. 34, № 2. – С. 83-86.
4. Горбенко Н.И., Полторак В.В. Молекулярні механізми порушення інсулінової секреції у хворих на цукровий діабет 2 типу та можливість їх корекції за допомогою похідних бурштинної кислоти (огляд літератури та результати власних досліджень) // Ендокринологія. – 2002. – Т. 7, № 2. – С. 233-241
5. Полторак В.В., Горбенко Н.И., Сакало Е.А. Профилактика сахарного диабета I типа: патофизиологическое обоснование, стратегия и клиническая реализация // Укр. мед. часопис. – 2001. – Т. 22, № 2. – С. 83–91.
6. Полторак В.В., Горбенко Н.И. Экспериментальне вивчення нових гіпоглікемічних засобів // Доклінічні дослідження лікарських засобів / За ред. член-кор. АМН

України О.В. Стефанова. – К., 2001. – С. 396-408.

7. Gorbenko N., Poltorak V., Gladkich A. Phensuccinal improves beta-cell function in streptozotocin-treated newborn rats // Diabetes Metabol. – 2003. – Vol. 29. – P. 4S267.
8. Karvonen M., Viik-Kajander M., Moltchanova E. et al. Incidence of childhood type I diabetes world-wide // Diabetes Care. – 2000. – Vol. 23, № 12. – P. 1516–1526.
9. Like A., Rossini A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus // Science. – 1976. – V. 193. – P. 415-417.
10. Matthews D.R., Hosker J.R., Rudenski A.S. et al. Homeostasis model assessment insulin resistance and β-cell function from fasting plasma glucose and insulin // Diabetologia. – 1985. – Vol. 28, № 4. – P. 412–419.
11. Wright J., Fraser R., Kapoor S. Essential fatty acid deficiency prevents multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in native and cyclosporin-treated low-responder murine strains // Acta Diabetologica. – 1995. – Vol. 32. – P. 125.
12. Wright J., Haliburton B., Russell H. The anti-diabetogenic effect of essential fatty acid deficiency in multiple low-dose streptozotocin-treated mice persists if essential fatty acid repletion occurs outside a brief window of susceptibility // Diabetologia. – 1991. – Vol. 34. – P. 709-714.

## АНТИДИАБЕТОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ ПРОИЗВОДНОГО СУКЦИНАНИЛОВОЙ КИСЛОТЫ В УСЛОВИЯХ АБСОЛЮТНОЙ ИНСУЛИНОВОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ АУТОИММУННОГО ГЕНЕЗА

**О.Н. Кириченко, <sup>1</sup>В.В. Полторак**

*Национальный фармацевтический университет, Харьков*

*<sup>1</sup>Институт проблем эндокринной патологии имени В.Я. Данилевского АМН Украины, Харьков*

**Резюме:** изучено влияние профилактического введения фенилэтиламида сукцинаниловой кислоты на развитие абсолютной инсулиновой недостаточности аутоиммунного генеза (модель низкодозового стрептозотоцинового диабета у мышей). Установлено, что применение соединения способствует улучшению глюкозного гомеостазу и снижению степени лимфоцитарной инфильтрации в панкреатических островках экспериментальных животных.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 1 типа, фенилэтиламид сукцинаниловой кислоты, антидиабетогенные свойства.

## ANTIDIABETOGENIC EFFECT OF SUCCINANYLIC ACID DERIVATIVE IN THE ABSOLUTE INSULIN INSUFFICIENCY OF AUTOIMMUNE GENESIS

O.M. Kirichenko, <sup>1</sup>V.V. Poltorak

National University of Pharmacy, <sup>1</sup>Institute for Endocrine Pathology Problems by V.Ya. Danylevsky of AMS of Ukraine, Kharkiv

**Summary:** preventive effect of phenylethylamide of succinanylic acid on the absolute insulin insufficiency development was studied on the model of low-dose-streptozotocin-induced diabetes in mice. Administration of compound has been established to improve glycaemic control and to decrease the degree of lymphocytic infiltration in pancreatic islets of experimental animals.

**Key words:** type 1 diabetes mellitus, phenylethylamide of succinanylic acid, antidiabetogenic action.

Рекомендована д-м біол. наук, проф. К.А. Посоховою

УДК 615.217.3:544.475:547.466.64:616.8 – 009.12

## ПРОТИСУДОМНІ ЕФЕКТИ КОМБІНАЦІЇ КАРБАМАЗЕПІНУ З АНТАГОНІСТОМ ГЛУТАМАТНИХ РЕЦЕПТОРІВ – РИЛУЗОЛОМ

©К.О. Кравченко, В.І. Опришко, В.Й. Мамчур

Дніпропетровська державна медична академія

**Резюме:** роботу присвячено експериментальній оцінці протисудомної дії комбінації класичного антиконвульсанта карбамазепіну (10, 15 мг/кг) з антагоністом глутаматних рецепторів рилузол (5, 10 мг/кг) на щурах. Як моделі судом використовували коразоловий тест і максимальний електрошок. Виявлено посилення протисудомного ефекту підпорогової дози карбамазепіну з метою зниження його нейротоксичної дії.

**Ключові слова:** карбамазепін, рилузол, протисудомні ефекти.

**Вступ.** При сучасному медикаментозному забезпеченні на даний час лікування епілепсії все ж таки залишається значною проблемою. Насамперед, це зумовлено наявністю значної кількості форм цієї патології, а застосування відомих протисудомних засобів супроводжується їх серйозною побічною дією їх, і саме щодо ЦНС. Наявність великої кількості нейромедіаторних амінокислот в різних відділах нервової системи, їх унікальна фізіологічна роль в роботі мозку, в механізмах нервово-психічної діяльності та пластичності можуть вказувати на перспективність використання сполук, які впливають на глутаматергічну нейромедіаторну систему як лікарських засобів різного типу дії (протисудомних, протиішемічних, нейропротективних засобів, анальгетиків та ін.) [1].

Тетразолілгліцин – потужний селективний агоніст NMDA-рецепторів, викликає судом, є ексайтотоксином, використовується в наукових дослідженнях [18]. AP7 – вибірково уповільнює

активний центр NMDA-рецептора, має ефекти антиконвульсанта у щурів, генетично схильних до епілепсії. Судоми викликали інтраперітонеальним введенням пілокарпіну 380 мг/кг після ін'єкцій AP7 в структури мозку – ретикулярну формацію, нігральну субстанцію або нуклеус [17]. CGP-37849 – сильний антиконвульсанта в експериментах на тваринах, досліджувався для лікування епілепсії [14]. Мідафотел – спочатку розроблений як потенційна терапія ексайтотоксичності, епілепсії або невропатичного болю. Є конкурентним антагоністом NMDA, не впливає на інші рецептори. Препарат блокував світлочутливі епілепсії у бабуїнів. Проте він був виключений з клінічних випробувань, оскільки не забезпечив чіткої протисудомної дії при епілепсії, а також мав побічні ефекти, які привели до виведення багатьох пацієнтів із досліджень [16]. PEAQX – у випробуваннях на тваринах надає захисний ефект на моделі максимального електрошоку в