

# ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

Е. Н. Калапко<sup>1</sup>, С. Ю. Штрыголь<sup>1</sup>, Т. В. Горбач<sup>2</sup>,  
Ю. Б. Ларьяновская<sup>1</sup>, С. И. Мерзликин<sup>1</sup>

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ N,N'-(ЭТАН-1,2-ДИИЛ)БИС(ХИНОЛИН-2-КАРБОКСАМИДА), ДИАКАМФА ГИДРОХЛОРИДА И МЕТФОРМИНА В ОСТРОМ ПЕРИОДЕ АЛЛОКСАНОВОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА У КРЫС

<sup>1</sup>Национальный фармацевтический университет, г. Харьков, Украина

<sup>2</sup>Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина

*Лечение сахарного диабета, относящееся к важнейшим проблемам современной медицины и фармации, требует поиска новых лекарственных средств и углубленного изучения механизмов известных. Целью данной работы стал сравнительный анализ влияния новых средств N,N'-(этан-1,2-диил)бис(хинолин-2-карбоксамида) в дозе 11,64 мг/кг, диакамфа гидрохлорида (25 мг/кг) и метформина (100 мг/кг), вводимых в желудок в лечебном режиме, на выживаемость, состояние углеводного и белкового обмена, интенсивность липопероксидации, уровень TNF- $\alpha$ , а также гистоструктуру поджелудочной железы крыс в остром периоде аллоксанового сахарного диабета у крыс. N,N'-(этан-1,2-диил)бис(хинолин-2-карбоксамид) и диакамфа гидрохлорид достоверно повышают выживаемость, уменьшают гипергликемию, гипоинсулинемию, содержание TNF- $\alpha$  в крови, степень повреждения островковых  $\beta$ -клеток и нарушений гистоструктуры поджелудочной железы, нормализуют уровень гликогена в печени, проявляют антиоксидантные свойства. Оба средства имеют преимущества перед метформином, который, уменьшая степень повреждения поджелудочной железы, не снижает раннюю летальность, вызывает гиперлакацидемию и гипопротеинемию.*

*Ключевые слова:* аллоксановый сахарный диабет, N,N'-(этан-1,2-диил)бис(хинолин-2-карбоксамид), диакамф, метформин.

### ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) – одно из наиболее распространенных и социально значимых заболеваний – представляет собой актуальную проблему здравоохранения. Более 90% случаев приходится на СД 2 типа [1–3]. Лечение СД остается недостаточно эффективным.

В поиске новых антидиабетических средств привлекает внимание N,N'-(этан-1,2-диил)бис(хинолин-2-карбоксамид) (N,N'-ЭБХК). Это соединение, известное противоопухолевыми свойствами за счет активации каспазы-3 и индукции апоптоза [4], оказывает гипогликемический эффект на модели сформировавшегося аллоксанового СД при различных путях введения [5–7]. N,N'-ЭБХК является агонистом имидазолиновых рецепторов обоих типов – I<sub>1</sub> и I<sub>2</sub> [8, 9], что нетипично для известных противодиабетических средств. N,N'-

ЭБХК характеризуется малой токсичностью при внутрижелудочном введении (IV класс токсичности, ЛД<sub>50</sub> = 633,45 мг/кг) и большой широтой терапевтического действия. Диапазон эффективных доз N,N'-ЭБХК на модели аллоксанового СД – 7,92–31,67 мг/кг с нелинейной зависимостью «доза-эффект», ЕД<sub>50</sub> = 11,64 мг/кг, терапевтический индекс (ТИ) – 54,42. При внутрибрюшинном введении в дозе 1,5 мг/кг N,N'-ЭБХК снижает гликемию у диабетических крыс, превышая эффект метформина в дозе 100 мг/кг, а ЛД<sub>50</sub> = 10,005 мг/кг (III класс токсичности – умеренно токсичные вещества). Ценно отсутствие сахароснижающего действия N,N'-ЭБХК при нормогликемии (при введении внутрь оно проявляется лишь в дозе 15 мг/кг) [5], что выгодно отличает это соединение от производных сульфонилмочевины.

Другое направление поиска оригинальных противодиабетических средств

привело к созданию производного бензимидазола – ( $\pm$ )-*cis*-3-(2'-бензимидазолил)-1,2,2-триметилциклопентанкарбоновой кислоты гидрохлорида (диакамфа гидрохлорида, ДГ). Его антигипергликемическое действие, наиболее выраженное в диапазоне доз 10–25 мг/кг, обусловлено стимуляцией панкреатических  $\beta$ -клеток, возбуждением  $I_2$ -имидазолиновых рецепторов, уменьшением инсулинорезистентности, мощной антиоксидантной активностью [10, 11]. Удобный для создания инъекционного раствора водорастворимый ДГ, как и эффективный на разных моделях СД диакамф, обладают ценными церебропротекторными и ноотропными свойствами, в механизм которых вовлечена стимуляция  $I_1$ -имидазолиновых рецепторов [12, 13]. По величине  $LD_{50}$  (3000 мг/кг) ДГ относится к малотоксичным веществам (IV класс токсичности), а по широте терапевтического действия превосходит  $N,N'$ -ЭБХК (ТИ в разных исследованиях достигает 120–300) [13].

Механизм действия производного гуанидина – диметилбигуанида (метформина), широко применяемого при СД 2 типа, несмотря на давнюю историю изучения, далек от ясности. Он способствует поглощению и утилизации глюкозы мышечной тканью, устраняет инсулинорезистентность, угнетает глюконеогенез [10]. Однако метформин эффективен и на аллоксановой модели, по патогенетическим особенностям приближающейся к СД 1 типа, а в механизме его действия принимает участие стимуляция  $I_2$ -имидазолиновых рецепторов [11, 14]. Поэтому целесообразно сравнить его с  $N,N'$ -ЭБХК и ДГ, влияние которых на уровень инсулина, а также другие функциональные показатели и морфологическое состояние поджелудочной железы (ПЖ) на аллоксановой модели СД неизвестно. Выяснение особенностей этого влияния составило цель настоящей работы, что обусловлено важностью углубления знаний о механизмах действия противодиабетических средств.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проведены в весенний период на 55 белых беспородных крысах-самцах массой 155–185 г, содержащихся согласно правилам GLP в стандартных условиях вивария ЦНИЛ Национального фармацев-

тического университета (НФаУ). Все процедуры и эвтаназию осуществляли с соблюдением принципов «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1986) [15].

Крысы были разделены на 5 групп: 1-я группа – интактные животные ( $n=8$ ), 2-я – контрольная патология (КП): модель СД без лечения ( $n=18$ ), 3-я – животные с СД, получавшие  $N,N'$ -ЭБХК в дозе 11,64 мг/кг [5] ( $n=9$ ), 4-я – крысы с моделью СД, получавшие ДГ в дозе 25 мг/кг ( $n=9$ ) [11], 5-я – животные, получавшие метформин в дозе 100 мг/кг [11, 14] ( $n=11$ ). Все исследуемые средства вводили в желудок через зонд ежедневно 2 раза в день в течение 3 суток с момента моделирования СД, первую дозу – через 90 мин после аллоксана. ДГ получен на кафедре токсикологической химии НФаУ докт. фарм. наук, проф. С.И. Мерзликиным.  $N,N'$ -ЭБХК синтезирован на кафедре органической химии Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина канд. хим. наук Б.В. Папоновым. Использовали субстанцию метформина (Sigma, США).

Аллоксановый СД моделировали подкожным введением 5% водного раствора аллоксана моногидрата (Sigma, США) однократно в дозе 150 мг/кг в виде 5% раствора в ацетатном буфере, pH 4,5 [16]. Выбор этой модели обусловлен тем, что именно она является базовой при доклиническом изучении потенциальных противодиабетических средств [17, 18]. Животные предварительно голодали в течение 24 ч при свободном доступе к воде. Исследования выполняли в острой фазе действия аллоксана – через 3 суток, когда разрушение  $\beta$ -клеток ПЖ достигает максимума [19].

Регистрировали выживаемость животных. Через 2 часа после последнего введения препаратов выживших крыс декапитировали под наркозом (тиопентал натрия), получали плазму крови (антикоагулянт – гепарин *in vitro*), выделяли ПЖ и печень.

В плазме крови определяли инсулин с помощью набора ELISA (Германия), глюкозу – глюкозооксидазным методом с использованием стандартных наборов (ТОВ НВП "Філісіт-Діагностика", Украина), лактат – колориметрическим методом с помощью набора ЛАКТАТ-ВИТАЛ (Россия), пируват – модифицированным методом Умбрайт. Гликоген в печени определяли

антроновым методом [20]. Для оценки интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенате печени определяли содержание ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) по методу Стальной Г.Д. [21]. Состояние антиоксидантной системы оценивали по активности каталазы в плазме крови методом М.А. Королюка и соавт. [22] и супероксиддисмутазы (СОД) методом аутоокисления адреналина [23]. Белок в гомогенате печени определяли по методу Lowry, общий белок и альбумины в плазме крови – с помощью стандартных наборов (ТОВ НВП "Філісіт-Діагностика", Украина). Мочевину в плазме крови определяли диацетилмонооксимным методом, маркеры цитолиза – активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и аланин-аминотрансферазы (АлАТ) – по методу Райтмана-Френкеля, фактор некроза опухоли альфа (TNF- $\alpha$ ) – маркер воспалительного ответа, влияющий на чувствительность к инсулину, – с помощью стандартных наборов (ТОВ НВП "Філісіт-Діагностика", Украина) [24].

Гистоструктуру ПЖ изучали светооптическим методом. Органы фиксировали в 10% растворе формалина, обезвоживали в спиртах возрастающей крепости, заливали в парафин, срезы окрашивали гематоксилином и эозином [25]. На срезах ПЖ определяли оптическую плотность панкреатических островков (общее количество островков в препарате), островковый

профиль (количество  $\beta$ -клеток в островке) и функциональный индекс (ФИ) – отношение  $\beta$ -клеток к  $\alpha$ -клеткам. С помощью программы Tourcam Granum измеряли периметр панкреатических островков (мкм). По содержанию  $\beta$ -клеток и периметру островков последние распределяли на мелкие, средние и крупные, рассчитывая их соотношение. Использовали микроскоп Granum, микропрепараты фотографировали цифровой видеокамерой Granum ДСМ 310. Фотоснимки обрабатывали на компьютере Pentium 2,4GHz с помощью программы Tour View.

Результаты обрабатывали статистически с использованием стандартного пакета статистических программ «Statistica 6,0» [26]. При учете результатов в альтернативной форме (выживаемость/гибель) применяли угловое преобразование Фишера.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Интегральным защитным эффектом исследуемого средства является выживаемость, которая на 3-й день в группе КП составила 88,9% (16 из 18 животных,  $p < 0,05$  относительно интактного контроля), на фоне метформина – 91,1% (10/11), а в группах N,N'-ЭБХК и диакамфа – по 100% ( $p < 0,05$  относительно показателя КП).

Состояние углеводного обмена в отдельных группах существенно различалось (таблица 1). У крыс группы КП имела

Таблица 1 – Влияние N,N'-(этан-1,2-диил)бис(хинолин-2-карбоксамид), диакамфа гидрохлорида и метформина на показатели углеводного обмена на модели аллоксанового сахарного диабета у крыс (3 сутки)

Показатели	Интактный контроль	Модель сахарного диабета			
		Контрольная патология	N,N'-(этан-1,2-диил)бис(хинолин-2-карбоксамид)	Диакамфа гидрохлорид	Метформин
Глюкоза крови, ммоль/л	6,23±0,23	20,26±3,91*	16,02±2,68*	13,87±2,36*	14,01±3,47*
Инсулинемия, мкМЕ/мл	2,96±0,17	0,43±0,08*	0,89±0,20*#	1,19±0,29*#	0,81±0,10*#
Гликоген печени, мг/г	15,3±5,25	5,92±0,51	27,5±5,45#	13,5±3,80	16,9±1,25#
Лактат плазмы крови, ммоль/л	1,43±0,29	2,46±0,28*	2,96±0,69	2,13±0,57	3,24±0,72*
Пируват плазмы крови, ммоль/л	0,26±0,04	0,44±0,06*	0,54±0,06*	0,41±0,04*	0,52±0,05*
Лактат/ пируват	5,63±0,65	6,00±0,60	5,23±0,69	4,99±0,69	5,64±1,06

Примечание: Статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ): \* – по отношению к интактному контролю, # – по отношению к контрольной патологии.

место выраженная гипергликемия (уровень глюкозы в крови возрос в среднем в 3,25 раза,  $p < 0,01$ ) на фоне почти семикратного снижения уровня инсулина в крови ( $p < 0,001$ ) и более чем двукратного уменьшения содержания гликогена в печени. Достоверно (в среднем на 72%,  $p < 0,05$ ) возрастала концентрация лактата в крови, однако за счет роста концентрации пирувата, имеющего, очевидно, компенсаторный характер, коэффициент «лактат/пируват» имел лишь тенденцию к увеличению.

Все исследуемые средства способствовали снижению гипергликемии на уровне тенденции (таблица 1). Для достоверного антигипергликемического эффекта, оказываемого ими [11, 13], очевидно, необходим более продолжительный курс лечения. Но состояние углеводного обмена в соответствующих группах значительно различалось.

Прежде всего, необходимо отметить достоверно большее (в 2–3 раза по сравнению с показателем КП) содержание инсулина в крови под влиянием N,N'-ЭБХК, метформина и особенно ДГ, хотя уровень гормона оставался в 2,5–3,7 раза ниже, чем в интактном контроле ( $p < 0,001$ ). Все они препятствовали снижению содержания

гликогена в печени, содержание которого под влиянием N,N'-ЭБХК даже обнаруживало тенденцию к увеличению по сравнению с интактным контролем. Метформин способствовал значительному (в среднем в 2,3 раза,  $p < 0,05$ ) увеличению лактацидемии, на фоне остальных исследуемых средств это увеличение было статистически незначимым. При этом значительно увеличивался уровень пирувата, и коэффициент «лактат/пируват» ни в одной группе не имел достоверных различий с показателем как интактного контроля, так и КП, хотя в сравнении с последним проявлял тенденцию к снижению, особенно под влиянием ДГ.

Состояние белкового обмена в исследуемых группах также различалось (таблица 2). В группе КП наблюдалась тенденция к гипопроteinемии, на фоне экспериментальной терапии N,N'-ЭБХК и ДГ содержание общего белка в сыворотке крови практически не изменялось, а метформин вызывал достоверную гипопроteinемию ( $p < 0,05$  против интактного контроля) – главным образом за счет альбуминов, уровень которых оказался ниже, чем в группе ДГ.

Таблица 2 – Влияние N,N'-(этан-1,2-диил)бис(хинолин-2-карбоксамид), диакамфа гидрохлорида и метформина на показатели белкового обмена на модели аллоксанового сахарного диабета у крыс (3 сутки)

Показатели	Интактный контроль	Модель сахарного диабета			
		Контрольная патология	N,N'-(этан-1,2-диил) бис(хинолин-2-карбоксамид)	Диакамфа гидрохлорид	Метформин
Общий белок плазмы крови, г/л	67,42±1,40	62,30±4,07	64,37±3,70	69,07±4,54	61,52±1,70*
Альбумины, г/л	29,78±0,88	30,21±1,09	30,10±1,22	31,80±1,01	28,62±0,80 <sup>§</sup>
Мочевина плазмы крови, ммоль/л	5,40±0,49	26,09±10,29*	10,67±4,40 <sup>#</sup>	11,35±3,67 <sup>#</sup>	7,20±1,36 <sup>#</sup>

Примечание: статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ): \* – по отношению к интактному контролю, # – по отношению к контрольной патологии, § – по отношению к группе диакамфа гидрохлорида.

Содержание мочевины в плазме крови крыс группы КП значительно возрастало – в среднем в 4,8 раза по сравнению с показателем интактных животных ( $p < 0,05$ ). Гиперазотемия, очевидно, имеет ретенционное происхождение вследствие угнетения выделительной функции почек, характерного для аллоксановой модели СД [27]. Под влиянием всех исследуемых средств содержание мочевины в крови достоверно

снижалось, особенно на фоне метформина, хотя и не нормализовалось полностью (таблица 2).

Как видно из таблицы 3, в остром периоде аллоксанового СД содержание TNF- $\alpha$  в крови возрастало в среднем в 2,5 раза ( $p < 0,001$  против интактного контроля). Под влиянием всех противодиабетических средств этот показатель статистически значимо снижался в сравнении с таковым

в группе КП (в 1,5–1,65 раза), оставаясь, однако, достоверно выше, чем в интактном контроле. Будучи многофункциональным провоспалительным маркером, TNF- $\alpha$  влияет на липидный метаболизм, гемокоагуляцию и чувствительность к инсулину [28, 29]. Нормализация его содержания в крови свидетельствует об иммунотропных свойствах всех трех исследуемых средств,

что способствует уменьшению инсулинорезистентности.

Значительные изменения маркеров цитолиза (активность АлАТ и АсАТ) отсутствовали. Выявлена лишь тенденция к ее повышению в крови в группе КП, тогда как на фоне всех противодиабетических средств она не превышает норму (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние N,N'-(этан-1,2-диил)бис(хинолин-2-карбоксамид), диакамфа гидрохлорида и метформина на содержание TNF- $\alpha$ , маркеры цитолиза и прооксидантно-антиоксидантный баланс на 3 сутки аллоксанового сахарного диабета у крыс

Показатели	Интактный контроль	Модель сахарного диабета			
		Контрольная патология	N,N'-(этан-1,2-диил)бис(хинолин-2-карбоксамид)	Диакамфа гидрохлорид	Метформин
Плазма крови					
TNF- $\alpha$ , пг/мл	28,23 $\pm$ 0,76	69,89 $\pm$ 4,70*	42,28 $\pm$ 6,45*#	46,49 $\pm$ 8,32*#	43,29 $\pm$ 5,09*#
АлАТ, ммоль/(ч·л)	0,78 $\pm$ 0,02	0,85 $\pm$ 0,08	0,74 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,02
АсАТ, ммоль/(ч·л)	1,41 $\pm$ 0,08	1,51 $\pm$ 0,20	1,26 $\pm$ 0,09	1,24 $\pm$ 0,20	1,27 $\pm$ 0,04
Коэффициент де Ритиса	1,78 $\pm$ 0,06	1,79 $\pm$ 0,05	1,70 $\pm$ 0,13	1,60 $\pm$ 0,10	1,69 $\pm$ 0,07
Печень					
ТБК-АП, нмоль/г ткани	21,53 $\pm$ 2,89	38,13 $\pm$ 4,94*	27,79 $\pm$ 3,99#	25,30 $\pm$ 3,00#	24,23 $\pm$ 2,90#
Каталаза, мкмольН <sub>2</sub> О <sub>2</sub> /г ткани за с	0,74 $\pm$ 0,23	2,79 $\pm$ 1,17	1,36 $\pm$ 0,42	1,57 $\pm$ 0,41	2,00 $\pm$ 0,86
СОД, у.е. /г ткани	143,4 $\pm$ 8,95	137,6 $\pm$ 12,2	128, 9 $\pm$ 10,9	112,5 $\pm$ 25,7	167,2 $\pm$ 32,5

Примечание: статистически значимые различия (p<0,05): \* – по отношению к интактному контролю, # – по отношению к контрольной патологии.

В механизме диабетогенного действия аллоксана значительная роль принадлежит активации процессов ПОЛ [30–32]. В группе КП отмечалось значительное увеличение концентрации ТБК-АП в печени в среднем в 1,8 раза (p<0,05), все исследуемые противодиабетические средства достоверно нормализовали этот показатель (таблица 3).

Гистологически в ПЖ интактных крыс четко дифференцируются преобладающая экзокринная паренхима и инкреторный аппарат – островки с оптической плотностью 19,8 $\pm$ 1,53, среди которых количественно преобладают средние (таблица 4).

Ацинарные структуры плотно прилегают друг к другу, состоят из одного слоя железистых клеток, имеющих две по-разному окрашенные зоны: базальную базофиль-

ную, где находятся ядра, и апикальную эозинофильную с мелкими зернами зимогена (рисунок 1а, см. обложку журнала). Соотношение зон колеблется в пределах 1:1,5 – 1:2,5. Междольковая соединительная ткань представлена скудно, внутри- и междольковые выводные протоки, артерии и вены не изменены. Панкреатические островки округлой или овальной формы, четко отделены от окружающей ацинарной паренхимы. Эпителиоциты в островках расположены тяжами, разделенными капиллярами. Центральная часть островков плотно и равномерно заполнена  $\beta$ -клетками (80–90% общего количества инсулоцитов), периферия –  $\alpha$ -клетками (рисунок 1б, см. обложку журнала). Такая локализация островковых клеток типична для крыс [33]. ФИ составил 5,13 $\pm$ 0,04 (таблица 4).

Таблица 4 – Морфометрический анализ состояния инкреторного аппарата поджелудочной железы крыс через 3 дня после моделирования аллоксанового сахарного диабета и коррекции исследуемыми противодиабетическими средствами

Группа	Оптическая плотность островков	Распределение панкреатических островков по содержанию $\beta$ -клеток и периметру, % Me (LQ;UQ)			ФИ ( $\beta$ -/ $\alpha$ -клетки)
		мелкие – до 20 клеток, 300-550 мкм	средние – 21-60 клеток, 600-1200 мкм	крупные – >60 клеток, 1400-2500 мкм	
Интактный контроль	19,8±1,53	25,9±2,46	55,2±1,92	18,9±3,31	5,13±0,04
Контрольная патология (диабет)	5,25±0,37*	73,0±8,26*	23,16±4,65*	3,86±1,50*	0,28±0,01*
Диабет + N,N'-ЭБХК	12,2±1,34*#	54,8±3,35*#	43,0±3,93*#	2,20±1,39*	2,08±0,35*#
Диабет + ДГ	11,6±1,53*#	52,9±3,03*#	44,5±2,39*#	2,60±0,26*	2,09±0,43*#
Диабет + метформин	12,4±0,96*#	52,2±2,56*#	44,6±2,61*#	3,20±1,53*	2,05±0,10*#

Примечание: N,N'-ЭБХК – N,N'-(этан-1,2-диил)бис(хинолин-2-карбоксамид), ДГ – диакамфа гидрохлорид, ФИ – функциональный индекс; статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ): \* – по отношению к интактному контролю, # – по отношению к контрольной патологии.

Через 3 дня после введения аллоксана в ПЖ крыс группы КП достоверно ( $p < 0,001$ ) уменьшалось количество островков – их оптическая плотность снизилась в среднем в 3,8 раза (таблица 4). В оставшихся островках имел место отек стромы, дегенеративные изменения и гибель  $\beta$ -клеток в виде апоптоза, карио- и цитолиза. При массивном характере поражения страдали и  $\alpha$ -клетки – цитоплазма становилась ацидофильной, конденсированной, ядерный материал имел вид фрагментов разной величины (рисунок 2, см. обложку журнала).

В группе КП выявлены почти «пустые» островки – очевидно, после массовой гибели клеток (рисунок 3а, см. обложку журнала). Иногда островки практически исчезали (рисунок 3б, см. обложку журнала). Наряду с дегенеративно или апоптотически измененными  $\beta$ -клетками видны пролифераты в местах локализации  $\alpha$ -клеток или бессистемно по всему островку (рисунок 4, см. обложку журнала). Это могут быть  $\alpha$ -клетки, а также дельта-клетки. В результате гибели  $\beta$ -клеток ФИ снизился (таблица 4) в 18,3 раза – до 0,28 ( $p < 0,001$ ). Периметр островков часто не совпадал с островковым профилем. Например, островок с периметром 2019 мкм содержал не более 30 клеток, а с периметром 442 мкм – 23 клетки. Это затрудняло распределение островков на мелкие, средние и крупные, но визуально и морфометрически значительно уменьшилось количество сред-

них (на 32%,  $p < 0,01$ ) и крупных (на 15%,  $p < 0,05$ ), а мелких – увеличилось в 2,8 раза,  $p < 0,01$  (таблица 4). Часто островки приобретали неправильную форму, четкая граница с окружающей ацинозной паренхимой отсутствовала.

Типично значительное уменьшение базофильно окрашенной зоны ацинарных клеток, деструкция ацинусов (рисунок 5а, см. обложку журнала). В междольковых артериях имеет место фибриноидное набухание сосудистой стенки, повышение проницаемости с периваскулярными плазморрагиями, макрофагальная реакция (рисунок 5б, см. обложку журнала).

У 40% животных, получавших N,N'-ЭБХК, эндокринная составляющая в дольках ПЖ по сравнению с показателями группы КП увеличена (до 13–16 на микропрепарат). Островки в основном типичной формы, густо и равномерно заполнены клетками с тенденцией к характерному расположению тяжами (исходя из локализации –  $\beta$ -инсулиноцитами), четко отделены от ацинозной ткани. Большинство островковых клеток без признаков деструкции и дистрофии, ядра их мономорфны (рисунок 6, см. обложку журнала). Количество  $\beta$ -клеток от 33 до 70 на островок, хотя периметр последних не превышал 870 мкм (у интактных животных периметр островков с таким количеством клеток составлял 900–1600 мкм). В части островков наблюдалась умеренная пролиферация

$\alpha$ -клеток. ФИ инкреторного аппарата у этих крыс возрос до 3,19.

У остальных 60% животных на фоне N,N'-ЭБХК возросло количество панкреатических островков (до 10,66 на микропрепарат), но среди них много мелких, нередко с дистрофически измененными клетками и зонами опустошения (рисунок 7, см. обложку журнала). Количество  $\beta$ -клеток не превышало 30, периметр островков – от 250 до 400 мкм, ФИ составлял 1,35. В сравнении с КП оптическая плотность островков возросла в 2,3 раза ( $p < 0,001$ ), доля средних островков – в 1,86 раза ( $p < 0,02$ ), количество мелких островков снизилось в 1,75 раза (таблица 4).

У большинства животных, получавших N,N'-ЭБХК, имели место пролиферация протокового эпителия, мелкие участки дезорганизации ацинусов, нарушения целостности стенки междольковых артерий. Отмечались единичные диапедезные кровоизлияния, фибриноидное набухание артериальной стенки, плазморрагии (рисунок 8, см. обложку журнала). Мозаично обнаруживались участки с разным функциональным состоянием ацинарных клеток (рисунок 9, см. обложку журнала).

Аналогичное влияние оказал ДГ. У 2 из 5 животных (40%) повышалась численность панкреатических островков (15–16), насыщенность их  $\beta$ -клетками с нормальными морфологическими характеристиками. Имели место и островки с опустошением центральных отделов, признаками кардио- и цитолиза инсулиноцитов, отеком стромы (рисунок 10, см. обложку журнала). Содержание  $\beta$ -клеток на островок колебалось от 25 до 77, периметр островка – от 701 до 1318 мкм. ФИ инкреторного аппарата этих крыс достигал 3,04.

У остальных 60% крыс панкреатические островки относительно немногочисленны (8–10) с преобладанием мелких, клетки часто с признаками деструкции, видны зоны опустошения (рисунок 11а, см. обложку журнала). Но и в таких островках прослеживалось стимулирующее влияние ДГ на  $\beta$ -клетки в виде митоза последних (рисунок 11б, см. обложку журнала). Количество  $\beta$ -клеток редко превышало 26, периметр островков – от 200 до 500 мкм, функциональный индекс составлял 1,47. В среднем в группе животных, получавших ДГ, оптическая плотность островков ПЖ составила 11,6 ( $p < 0,01$  против КП),

количество средних островков превысило таковое в КП в 1,92 раза ( $p < 0,01$ ), мелких – снизилось в 1,38 раза, ФИ составил 2,09 (таблица 4).

В экзокринной части ПЖ у всех крыс обнаруживались обширные участки, содержащие ацинусы, в клетках которых расширена зимогенсодержащая зона цитоплазмы, что приводило к очаговому нарушению рисунка ткани. Отмечена умеренная пролиферация эпителия меж- и внутридольковых выводных протоков. Состояние стенки междольковых артерий без изменений (рисунок 12, см. обложку журнала).

При лечении метформином у всех крыс заметны положительные изменения состояния инкреторного аппарата ПЖ. Оптическая плотность панкреатических островков возросла в 2,36 раза, но их состояние значительно различалось – встречались и нормальные островки, и с деструктивно измененными  $\beta$ -клетками (рисунок 13, см. обложку журнала), и опустошенные, и заполненные пролиферирующими  $\alpha$ -клетками (рисунок 14, см. обложку журнала).

Число мелких островков уменьшилось в сравнении с КП на 20,8% ( $p < 0,05$ ) средних – возросло в 1,92 раза ( $p < 0,02$ ), хотя их периметр и островковый профиль не всегда соответствовали норме. ФИ составил 2,05,  $p < 0,001$  против КП (таблица 4).

Экзокринная часть железистой ткани у всех крыс этой группы не имела видимых нарушений структуры. В цитоплазме ацинозных клеток объем базофильной и эозинофильной зон часто значительно колеблется, стенки артерий не повреждены (рисунок 15, см. обложку журнала).

Обобщение результатов показывает, что через 3 суток после введения аллоксана в ПЖ выявляются грубые структурно-функциональные изменения в виде значительного (в 3,77 раза) уменьшения оптической плотности панкреатических островков, их деформации, массивной гибели  $\beta$ -клеток в виде апоптоза и некроза, пролиферации  $\alpha$ -клеток. В результате резко уменьшается ФИ инкреторного аппарата, уменьшается периметр островков, возникает несоответствие островкового профиля периметру островков. В стенке междольковых артерий выявляются дистрофические изменения в виде фибриноидного набухания, повышения проницае-

мости и периваскулярных плазморрагий. По данным литературы [34], такие изменения связаны с наблюдаемой гипoinsулинемией, нарушающей усвоение глюкозы клетками, и развитием дистрофических изменений в артериальной стенке. Отсутствием селективности влияния аллоксана только на  $\beta$ -клетки [30] поясняется выраженное функциональное напряжение ацинарных клеток экзокринной части ПЖ с появлением участков их деструкции.

Эти выраженные нарушения гистоструктуры ПЖ соответствуют тяжести состояния, приведшей к гибели 11,1% животных группы КП, и значительным метаболическим изменениям у выживших животных – резкой гипoinsулинемии и гипергликемии, лактоацидозу, истощению запаса гликогена в печени. Роль прооксидантных свойств аллоксана в механизме повреждения ПЖ подтверждает повышение содержания ТБК-АП в крови. О развитии воспалительного процесса с вовлечением сложных иммунологических механизмов свидетельствует более чем двукратное увеличение концентрации TNF- $\alpha$  в плазме крови. Кроме прямых провоспалительных и иммунорегулирующих свойств, TNF- $\alpha$  демонстрирует широкий спектр эффектов в сфере регуляции апоптоза, метаболических процессов. Он ослабляет трансдукцию инсулинового сигнала, снижая активность тирозинкиназы рецептора инсулина, уменьшает экспрессию внутриклеточных переносчиков глюкозы и снижает поступление глюкозы в мышечную и жировую ткань [28, 29].

Потенциальное противодиабетическое средство N,N'-ЭБХК проявляет лечебный эффект, повышая выживаемость крыс в критическом периоде экспериментального СД за счет увеличения устойчивости  $\beta$ -клеток к токсическому действию аллоксана. Морфологически это проявляется возрастанием количества островков в ПЖ, снижением выраженности апоптоза и некроза  $\beta$ -клеток, появлением функционально более полноценных, чем в группе КП, инсулиноцитов, соответствием островкового профиля периметру островков, уменьшением пролиферации  $\alpha$ -клеток, увеличением ФИ инкреторного аппарата. Указанные изменения хорошо согласуются с двукратным повышением инсулинемии относительно показателя группы КП, а также с возрастанием запаса гликогена в

печени, снижением выраженности ПОЛ, количества TNF- $\alpha$  и мочевины в крови. Уменьшение уровня TNF- $\alpha$  может быть предиктором ослабления инсулинорезистентности и эффективности N,N'-ЭБХК при СД 2 типа, что требует дальнейшего исследования.

Экспериментальная терапия диабетических животных ДГ также способствует 100% выживаемости в критическом периоде аллоксанового СД. Исследуемое антидиабетическое средство аналогично N,N'-ЭБХК улучшает морфофункциональное состояние ПЖ, причем особенно выражено (почти в 3 раза) увеличивает содержание инсулина в крови. Остальные биохимические и иммунологические маркеры противодиабетического эффекта ДГ выражены в такой же степени, что и на фоне N,N'-ЭБХК. Снижение уровня TNF- $\alpha$  в крови согласуется с установленным ранее уменьшением инсулинорезистентности под влиянием диакамфа [10].

Результаты исследования являются новым доказательством эффективности метформина на модели аллоксанового СД. Метформин не обеспечил полный защитный эффект по показателю летальности, что, возможно, связано с типичной для этого противодиабетического средства гиперлактацидемией (таблица 1). Однако у выживших животных отмечается улучшение гистоструктуры ПЖ и функциональных показателей, характеризующих состояние углеводного обмена, ПОЛ и иммунного ответа в сравнении с КП. Неблагоприятным эффектом метформина, кроме гиперлактацидемии, является гипопроteinемия, отсутствующая на фоне N,N'-ЭБХК и ДГ.

Таким образом, перспективные противодиабетические средства N,N'-ЭБХК и ДГ на модели аллоксанового диабета у крыс характеризуются политропным механизмом действия и не уступают, а по ряду показателей превосходят метформин.

## ВЫВОДЫ

1. На модели аллоксанового сахарного диабета у крыс установлено, что в остром периоде (3 сутки), когда отмечается массовая гибель панкреатических  $\beta$ -клеток, N,N'-(этан-1,2-диил)бис(хинолин-2-карбоксамид), диакамфа гидрохлорид и метформин оказывают терапевтический эффект.

2. N,N'-(етан-1,2-диіл)біс(хінолін-2-карбоксамід) і діакамфа гідрохлорид усувають ранню летальність діабетических животинок, зменшують вираженість гіперглікемії, гіпоінсулінемії, ступінь пошкодження островкових β-кліток і порушень гистоструктури піджелудочної залози, сприяють нормалізації вмісту глікогена в печінці, проявляють антиоксидантні властивості.

3. В механізмі дії N,N'-(етан-1,2-диіл)біс(хінолін-2-карбоксаміда) і діакамфа гідрохлориду приймає участь зменшення рівня TNF-α в крові.

4. N,N'-(етан-1,2-диіл)біс(хінолін-2-карбоксамід) і діакамфа гідрохлорид мають переваги перед метформіном, який, незважаючи на суттєве зменшення ступеня пошкодження піджелудочної залози, не забезпечує достовірне зниження ранньої летальності, викликає гіперлакемію і гіпопротеїнемію.

### SUMMARY

E. N. Kalapko, S. Yu. Shtrygol,  
T. V. Gorbach, Yu. B. Laryanovskaya,  
S. I. Merzlikin

A COMPARATIVE ANALYSIS  
OF N,N'-(ETHANE-1,2-DYYIL)  
BIS(QUINOLINE-2-CARBOXAMIDE),  
DIAKAMPH HYDROCHLORIDE,  
AND METFORMIN EFFICACY  
IN THE ACUTE PERIOD OF ALLOXAN-  
INDUCED DIABETES IN RATS

Being one of the most important problems of modern medicine and pharmacy, the treatment of diabetes mellitus requires the search for new drugs and in-depth study of the mechanisms of action of the known drugs. The objective of this study is to conduct comparative analysis of the influence of new drugs N,N'-(ethane-1,2-dyyil)bis(quinoline-2-carboxamide) and diakamph hydrochloride, as well as metformin (11.64 mg/kg, 25 mg/kg, 100 mg/kg respectively), administered intragastrically using a treatment regimen, on survival rate, carbohydrate and protein metabolism, the intensity of lipid peroxidation, the level of TNF-α, as well as histological structure of the pancreas in the acute period of alloxan-induced diabetes in rats. N,N'-(ethane-1,2-dyyil)bis(quinoline-2-carboxamide) and diakamph hydrochloride cause a statistically

significant increase in survival rate, reduction of hyperglycemia, hypoinsulinemia, TNF-α content in the blood, decrease in the degree of damage to islet β-cells as well as in the disturbances of histostructure of pancreas, normalize the hepatic glycogen levels and exhibit antioxidant properties. Both new drugs show advantages over metformin, which reduces the degree of damage to the pancreas, still not being able to reduce early mortality and causing hypoproteinemia and hyperlactacidemia.

Keywords: alloxan-induced diabetes, N,N'-(ethane-1,2-dyyil)bis(quinoline-2-carboxamide), diakamph, metformin.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Чернобров, А. Д. Довідник основних показників діяльності ендокринологічної служби України за 2011 рік / А. Д. Чернобров // Ендокринологія. – 2012. – Т. 17. – № 1. – 36 с.

2. Califf, R. M. Insulin resistance: a global epidemic in need of effective therapies / R. M. Califf // Eur. Heart J. Supplements. – 2003. – Vol. 5. – P. 13–18.

3. Kozak, B. M. International Diabetes Federation (IDF) highlights growing global impact of diabetes in 5th edition of the Diabetes Atlas / B. M. Kozak, M. Y. Tjota, K. L. Close // J. Diabetes – 2012. – Vol. 4. – P. 8–17.

4. Echeverria, M. Synthesis and biological evaluation of heteroaryl diamines as cytotoxic agents, apoptosis inducers and caspase-3 activators / M. Echeverria, B. Mendivil, L. Cordeu et al // Arch. Pharm. Chem. Life Sci. – 2006. – Vol. 339. – P. 182–192.

5. Гостра токсичність та гіпоглікемічна активність N,N'-(етан-1,2-диіл)біс(хінолін-2-карбоксаміду) / О. М. Калапко [та інш.] // Клінічна фармація. – 2014. – Т. 18. – № 12. – С. 41–45.

6. Застосування N,N'-(етан-1,2-диіл)біс(хінолін-2-карбоксаміду) як засобу з гіпоглікемічною дією: пат. 89726UA Україна: МПК А61Р 5/50 (2006. 01) А61К31/33 (2006. 01) А61К 31/195 (2006.01) / О. М. Калапко, С. Ю. Штриголь, Б. В. Папонов, С. В. Львов; заявник та власник НФаУ. – у 2013 14600; заявл. 13.12.2013; дата опубл. 25. 04. 2014 р. – Бюл. №8, 2014. – 3 с.

7. Калапко, О. М. Інноваційні перспективи використання N,N'-(етан-1,2-диіл)біс(хінолін-2-карбоксаміду) як потенційного гіпоглікемічного засобу

/ О. М. Калапко, С. Ю. Штриголь, Б. В. Папонов, С. В. Львов – Інформ. лист Укрмедпатентінформу МОЗ України № 120-2014 від 19.02.2014 р. про нововведення в системі охорони здоров'я. – К., 2014. – 5 с.

8. Investigation of the role of I1- and I2-imidazoline receptors in the mechanism of hypoglycemic action of N,N'-(ethane-1,2-diyil) bis(quinoline-2-carboxamide) / O.N. Kalapko [et al.] // *News of Pharmacy*. – 2014. – №3 – Vol. 79 – P. 74–77.

9. Калапко, О. М. Механізм антигіперглікемічної дії потенційного оригінального протидіабетичного препарату N,N'-(етан-1,2-диіл)біс(хінолін-2-карбоксаміду) / О. М. Калапко, С. Ю. Штриголь // Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології (Чотирнадцяті Данилевські читання), 2-3 березня 2015 року. – Харків: Видавництво Інституту проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України, 2015. – С. 72–73.

10. Сучасні аспекти пероральної фармакотерапії цукрового діабету 2 типу. Досягнення НФаУ: монографія / В. П. Черних, Л. М. Малоштан, Н. І. Горбенко [та інш.] // Х.: БУРУН і К, 2010. – 208 с.

11. Роль імідазолінових рецепторів I1 та I2 типів у реалізації механізму цукрознижувальної дії діакамфу гідрохлориду та метформіну / О. М. Калапко [та інш.] // Український біофармацевтичний журнал. – 2014. – № 3. – Т. 32. – С. 41–44.

12. Шатілова, О. А. Експериментальне вивчення церебропротекторних та психотропних властивостей діакамфу: автореф. дис. ... канд. фарм. наук / О. А. Шатілова. – Х., 2010. – 20 с.

13. Шведський, В. В. Корекція діакамфу гідрохлоридом порушень мозкового кровообігу на тлі цукрового діабету (експериментальне дослідження): автореф. дис. ... канд. мед. наук / В. В. Шведський. – Х., 2012. – 20 с.

14. Novel mechanism for plasma glucose-lowering action of metformin in streptozotocin-induced diabetic rats / J. T. Cheng [et al.] // *Diabetes*. – 2006. – Vol. 55. – P. 819–825.

15. Council of Europe. 1986. "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes". In Strasbourg: Council of Europe, Obtainable London: HMSO.

16. Dave, K. R. Effect of alloxan-induced diabetes on serum and cardiac butyryl cholinesterases in the rat / K. R. Dave, S. S. Katyare // *J. Endocrinol.* – 2002. – Vol. 175. – № 1. – P. 241–250.

17. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації / За ред. чл.-кор. НАМН України, акад. О.В. Стефанова. – К.: Авіценна, 2001. – 400 с.

18. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. д-ра мед. наук А. Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – Часть первая. – 944 с.

19. Алеева, Г. Н. Клеточные механизмы развития гипергликемии и её фармакологическая коррекция при аллоксановом диабете: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Г. Н. Алеева. – Казань, 2002. – 20 с.

20. Templeton, M. Microdetermination of glycogen with anthrone reagent / M. Templeton // *J. Histochem. Cytochem.* – 1961. – Vol. 9. – P. 670–672.

21. Стальная, И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // *Современные методы в биохимии* / ред. В. Н. Орехович. – М.: Медицина, 1977. – С. 66–68.

22. Королюк, М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк // *Лаб. дело*. – 1988. – № 1. – С. 16–19.

23. Сирота, Т. В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы / Т. В. Сирота // *Вопр. мед. химии*. – 1999. – Т. 45, № 3. – С. 263–272.

24. Камышников, В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. / В. С. Камышников. – Минск: «Беларусь», 2000. – Т. 1 – 495 с.

25. Меркулов, Г. А. Курс патологисто-логической техники / Г. А. Меркулов. – М.: Медицина, Ленингр. отд-ние, 1969. – 424 с.

26. Халафян, А. А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных. 3-е изд. Учебник / А. А. Халафян. – М.: ООО «Бином-Пресс», 2007. – 512 с.

27. Штриголь, В. С. Нефропротекторные свойства диакамфа на модели аллоксанового сахарного диабета у мышей / В. С. Штриголь, О. В. Товчига, С. И. Мерзликин // *Журнал клінічної та лабораторної медицини*. – 2009. – Т. 4, № 2. – С. 101–104.

28. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance / P. A. Kern [et al.] // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2001. – Vol. 280. – P. 745–751.

29. Lion, C. J. Minireview: Adiposity, Inflammation, and Atherogenesis / C. J. Lion, R. E. Law, W. A. Hsueh // Endocrinology. – 2003. – Vol. 144, N. 6. – P. 2195–2200.

30. Lenzet, S. Alloxan: history and mechanism of action / S. Lenzet, V. Panten // Diabetol. – 1988. – Vol. 31. – P. 337–342.

31. Effect of zinc on the lipid peroxidation and the antioxidant defense systems of the alloxan-induced diabetic rabbits // Free Radical Biology and Medicine. – 2007. – Vol. 42, Issue 10. – P. 1481–1486.

32. Ahmadvand, H. Amelioration of altered antioxidant enzymes activity and glomerulosclerosis by coenzyme Q10 in alloxan-induced diabetic rats / H. Ahmadvand, M. Tavafi, A. Khosrowbeygi // J. of Diabetes

and its Complications. – 2012. – Vol. 26, iss. 6. – P. 476–482.

33. Хэм, А. Гистология: Пер. с англ. / А. Хэм, Д. Кормак. – М.: Мир, 1983. – Т. 5. – 296 с.

34. Михайличенко, В. Ю. Роль инсулярных и контринсулярных гормонов в патогенезе аллоксанового диабета у крыс в эксперименте / В. Ю. Михайличенко, С. С. Столяров // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – С. 27–34.

**Адрес для корреспонденции:**

61002, Украина,  
г. Харьков, ул. Пушкинская, 53,  
Национальный фармацевтический университет,  
кафедра фармакологии  
и лекарственной токсикологии,  
тел. (+38099) 7936630,  
e-mail: shtrygol@mail.ru,  
Штрыголь С. Ю.

Поступила 14.03.2016 г.

С. С. Скринауц, С. С. Лазуко

**ВЛИЯНИЕ ТЕТРАЭТИЛАММОНИЯ НА ТОНУС КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ  
В УСЛОВИЯХ БЛОКАДЫ КОНСТИТУЦИОНАЛЬНОЙ И ИНДУЦИРУЕМОЙ  
NO-СИНТАЗЫ ДО И ПОСЛЕ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА**

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет

*Целью работы было выяснить влияние тетраэтиламмония на объемную скорость коронарного потока, индекс ауторегуляции, максимальный гиперемический поток, коронарный расширительный резерв и интенсивность перфузии в условиях блокады конституциональной и индуцируемой NO-синтазы. В результате исследования было показано, что стресс снижает влияние тетраэтиламмония на тонус коронарных сосудов. После перенесенного стресса на фоне блокады конституциональной NO-синтазы действие тетраэтиламмония на сосудистый тонус выражено в большей степени, чем в группе животных, перенесших стресс, с интактной системой синтеза NO, но при этом оставалось ниже, чем в контроле. После иммобилизации на фоне блокады индуцируемого монооксида азота влияние тетраэтиламмония на тонус сосудов восстанавливается до величин, обнаруженных в сердцах контрольных животных, не обработанных блокаторами синтеза монооксида азота. Таким образом, постстрессорное нарушение тонуса коронарных сосудов в значительной степени вызывается индуцируемой NO-синтазой, образующейся при стрессе.*

**Ключевые слова:** тонус сосудов, монооксид азота, тетраэтиламмоний, калиевые каналы.

**ВВЕДЕНИЕ**

Одной из главных причин заболеваемости и смертности населения в большин-

стве экономически развитых стран являются сердечно-сосудистые заболевания. В связи с этим, по-прежнему, актуальной проблемой физиологии сердечно-сосуди-