

УДК 616-008.6+577.125.8

DOI: 10.24959/ubphj.17.103

А. Л. ЗАГАЙКО, Т. О. БРЮХАНОВА

Національний фармацевтичний університет

ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ВПЛИВУ МЕТФОРМІНУ НА СИСТЕМУ НІТРОГЕН (II) ОКСИДУ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ У ЩУРІВ

Актуальність. Кардіоваскулярні ускладнення є однією з лідируючих причин смертності в усьому світі. Відомо, що захворювання, асоційовані з інсулінорезистентністю, часто супроводжуються розвитком ендотеліальної дисфункції та серцево-судинного континууму.

Мета роботи. Дослідження механізмів впливу метформіну – перорального гіпоглікемічного засобу на функціональний стан ендотелію на тлі інсулінорезистентності.

Результати та їх обговорення. Наведені результати експериментального дослідження біохімічних механізмів впливу перорального гіпоглікемічного засобу метформіну на систему Нітроген (II) оксиду за експериментальної інсулінорезистентності у щурів. Показано, що за модельної патології на 5 тижнів експерименту метформін достовірно підвищує сумарний вміст нітратів і нітритів та опосередковує помірне, проте вірогідне зростання показника цитруліну при незначному зниженні вмісту аргініну.

Висновки. Зазначена динаміка змін свідчить про клінічно значущий вплив досліджуваного препарату на функціональний стан ендотелію та може бути інтерпретовано як прояв ендотеліальних протекторних властивостей.

Ключові слова: інсулінорезистентність; метформін; ендотелій; Нітроген (II) оксид

A. L. Zagayko, T. O. Briukhanova

Mechanisms of metformin influence on the nitrogen oxide system investigation at experimental insulin resistance in rats

Topicality. Cardiovascular complications are among the leading causes of death in the world. It is known that diseases associated with insulin resistance, are often accompanied by endothelial dysfunction and cardiovascular continuum.

Aim. It is reasonable to investigate metformin mechanisms effect on the functional state of endothelium at experimental insulin resistance.

Materials and methods. The syndrome of insulin resistance was designed on Wistar rats – males by mass of a 180-220 g and age 3 months in the beginning of experiment, by daily long period intraperitoneal Dexamethazonum injections in low doses (15 mg/kg) in low-calorie diet conditions (29 % fats – predominantly saturated lipids), rich in fructose (1 g per day per 100 g of body weight) (water solution) over 5 weeks.

Results and discussion. The results indicate that in a model pathology group on 5 week of experiment, metformin significantly increases the total content of nitrates and nitrites and mediates a moderate, but significant increase in levels of citrulline, with a slight decrease in the arginine content.

Conclusions. The article presents the biochemical results mechanisms of influence on the nitrogen oxide system by the oral hypoglycemic agent metformin experimental investigation at experimental insulin resistance in rats. This pattern of changes suggests a clinically significant influence of metformin on endothelium functional state that can be interpreted as a manifestation of endothelium protection properties.

Key words: insulin resistance; metformin; endothelium; nitric oxide

А. Л. Загайко, Т. А. Брюханова

Исследование механизмов влияния метформина на систему оксида азота (II) при экспериментальной инсулинорезистентности у крыс

Актуальность. Кардиоваскулярные осложнения являются одной из лидирующих причин смертности во всем мире. Известно, что заболевания, ассоциированные с инсулинорезистентностью, часто сопровождаются развитием эндотелиальной дисфункции и сердечно-сосудистого континуума.

Цель работы. Исследование механизмов влияния метформина – перорального гипогликемического средства – на функциональное состояние эндотелия на фоне инсулинорезистентности.

Результаты и их обсуждение. В статье приведены результаты экспериментального исследования биохимических механизмов влияния перорального гипогликемического средства метформина на систему оксида азота (II) при экспериментальной инсулинорезистентности у крыс. Результаты свидетельствуют о том, что при модельной патологии на 5 неделю эксперимента метформин достоверно повышает суммарное содержание нитратов и нитритов и опосредует умеренное, однако достоверное увеличение уровня цитруллина при незначительном снижении содержания аргинина.

Выводы. Указанная динамика изменений свидетельствует о клинически значимом влиянии исследуемого препарата на функциональное состояние эндотелия, что может быть интерпретировано как проявление эндотелиальных протекторных свойств.

Ключевые слова: инсулинорезистентность; метформин; эндотелий; оксид азота (II)

ВСТУП

Відомо, що ускладнення серцево-судинних захворювань знаходяться на першому місці серед причин смертності в Україні [1]. Розвиток кардіоваскулярного континууму часто трапляється за умов інсулінорезистентності (ІР) та включає формування патологічних змін системи Нітроген (ІІ) оксиду і порушень функціонального стану ендотелію [2-3]. Зазначене потребує призначення адекватного лікування, яке включає вплив на різні складові патогенезу патології. При цьому слід уникати поліпрагматичної терапії, що є можливим за умов використання лікарського засобу з плейотропною активністю, який здатен корегувати різні складові патологічного процесу та дозволяє знизити кількість призначуваних препаратів.

Розвиток ендотеліальної дисфункції (ЕД) за ІР обумовлений порушенням співвідношення між вазоконстрикторними та вазодилатуючими факторами в бік збільшення продукції судинозвужуючих речовин. Крім того, за ІР відмічається модифікація різних молекул вільними радикалами та зниження біодоступності NO. Останнє опосередковано рядом причин, серед яких – окиснення Нітроген (ІІ) оксиду супероксидним аніоном з утворенням пероксинітриду, який окрім власної окислювальної активності здатен знижувати активність супероксиддисмутази та змінювати активність ендотеліальної NO-синтази (яка за таких умов продукує супероксид аніон радикал, а не NO) [3-4].

Впродовж останніх років зростає інтерес до дослідження біохімічних механізмів реалізації ефектів метформіну – одного з найбільш затребуваних засобів для корекції ІР [5]. Відповідно до літературних даних фармакодинаміка метформіну є не до кінця вивченою. Це пов'язано з тим, що специфічний рецептор до препарату так і не був виявлений, а вплив на цАМФ-залежну протеїнкіназу (АМПК) опосередковує наявність різних видів активності [5-9].

Метою нашої роботи було дослідження впливу метформіну на окремі показники системи Нітроген (ІІ) оксиду за експериментальної інсулінорезистентності у щурів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Синдром інсулінорезистентності моделювали на щурах-самцях популяції Wistar масою 180-220 г та віком 3 місяці на початок експерименту шляхом тривалого щоденного введення низьких доз дексаметазону внутрішньоочеревинно (доза 15 мкг/кг) при одночасному утриманні на висококалорійній дієті (містила 29 % жирів – переважно насичених ліпідів), збагаченій фруктозою (1 г на добу на 100 г маси тіла) у вигляді водного розчину протягом 5 тижнів [10].

Дослідження проводили відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджені з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових

цілей» (Страсбург, 1985) та Етичним кодексом Всесвітньої медичної асоціації (Гельсінська декларація, 1964).

Тварин розподілили на три експериментальні групи в залежності від мети експерименту:

- інтактний контроль (ІК) – здорові тварини, що утримувались на стандартному харчовому раціоні віварію Центральної науково-дослідної лабораторії Національного фармацевтичного університету;
- модельна патологія (МП) – інсулінорезистентність – тварини, яким протягом 5 тижнів вводили внутрішньоочеревинно синтетичний глюкокортикостероїд – дексаметазон (виробництва «KRKA», Словенія) у дозі 15 мкг/кг та утримували на висококалорійній дієті, що містила 29 % жиру (переважно насичені ліпіди) з додаванням фруктози (1 г на добу на 100 г маси тіла), що призводило до формування експериментальної інсулінорезистентності;
- група тварин, яким на фоні висококалорійної дієти та введення дексаметазону протягом 3 тижнів (починаючи з 2 тижня утримання на висококалорійній дієті і введення дексаметазону) за допомогою металевого зонду вводили внутрішньошлунково у вигляді водної суспензії метформіну гідрохлориду (виробництва «Menarini Group Berlin-Chemie AG», Німеччина) у дозі 5 мг на 100 г маси тіла з урахуванням коефіцієнта видової стійкості.

Всіх тварин декапітували під хлоразоло-уретановим наркозом. У декапітованих тварин збирали кров для отримання сироватки (шляхом центрифугування).

Концентрацію глюкози у сироватці крові тварин визначали натще з використанням глюкозооксидазного методу за допомогою глюкометра «One touch ultra easy» (виробництва LifeScan, Johnson&Johnson, США).

Рівень імунореактивного інсуліну (ІРІ) визначали у крові тварин натще з використанням методу радіоімунологічного аналізу *in vitro* з використанням стандартного набору реактивів виробництва «Immundiagnostik» (Німеччина).

Показник інсулінорезистентності (індекс НОМА-ІР) розраховували, виходячи з показників глюкози та ІРІ у крові тварин натще з використанням алгоритму НОМА (Homeostasis Model Assessment) [11].

Визначення вмісту аргініну в сироватці крові проводили фотометричним методом, що ґрунтується на реакції з α -нафтолу з гіпобромітним реактивом. Вміст цитруліну визначали за реакцією з діацетилмонооксимом у сильно кислому середовищі [12-13].

Визначали вміст нітритів та нітратів у сироватці крові спектрофотометричним методом з використанням реактиву Грісса. Метод базується на визначенні загального рівня сумарних метаболітів Нітроген (ІІ) оксиду (сироватку крові інкубують з реактивом Грісса без додавання ванадію хлориду (ІІІ), визначають спектрофотометрично). Від отриманого значення віднімали значення концентрації нітрит-іонів

Таблиця 1

**ВПЛИВ МЕТФОРМІНУ НА ПОКАЗНИКИ ВУГЛЕВОДНОГО ОБМІНУ В КРОВІ ЩУРІВ
ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ (M ± m, n = 10)**

Показники	Інтактний контроль	Модельна патологія	Модельна патологія + метформін
Глюкоза, ммоль/л	5,65 ± 0,44	14,29 ± 0,35*	6,92 ± 0,12**
ІРІ, пмоль/л	90,55 ± 2,31	153,03 ± 2,11*	108,23 ± 2,03**
Індекс ІР (НОМА-ІР)	1,73	3,75	2,16

Примітки: * – зміни достовірні відносно показників інтактного контролю (p ≤ 0,05); ** – зміни достовірні відносно показників модельної патології (p ≤ 0,05).

(сироватку крові інкубували з реактивом Грісса та додавали ванадію хлорид (III), визначали спектрофотометрично), отримуючи значення вмісту нітратів [12-13]. Використовували спектрофотометр СФ-46 (виробництва АО «ЛОМО»).

Статистичну обробку результатів проводили на персональному комп'ютері з використанням пакетів Excel та Statistica 6.0 for Windows, коефіцієнт кореляції визначали за Спірменом. Також визначали силу впливу фактора за допомогою дисперсійного аналізу (алгоритм ANOVA).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Утримання тварин на гіперкалорійній дієті з високим вмістом фруктози та одночасне ін'єктування дексаметазоном призводило до розвитку патологічних змін вуглеводного обміну, що підтверджувалось достовірними змінами показників глікемії: вміст глюкози та ІРІ зростали у 2,52 та 1,69 рази, відповідно, в порівнянні з показниками здорових тварин. Підтвердженням формування синдрому ІР було вірогідне зростання індексу ІР у 2,16 рази (табл. 1).

Ефекти метформіну щодо корекції порушень вуглеводного обміну є досить добре вивченими, проте для підтвердження його ефективності саме за умов наших експериментів нами було вивчено і досліджено його дію за експериментальної інсулінорезистентності. Препарат виявив виразний корегуючий вплив щодо гіперглікемії та гіперінсулінемії (показники достовірно не відрізнялись від показників тварин інтактного контролю). Підтвердженням ефективності за модельної патології було вірогідне зниження показника ІР – на 42,4 %. Механізми лікувального впливу метформіну базуються на пригніченні глюконеогенезу, підвищенні чутливості інсулінових рецепторів та підвищенні рівня глюкагоноподібного пептиду-1.

Зважаючи на те, що розвиток ІР тісно корелює з формуванням порушень функціонального стану ендотелію, наступним етапом нашого дослідження була оцінка змін показників системи Нітроген (II) оксиду. Метформін, що відноситься до терапії першої лінії патологій, асоційованих з ІР, доцільним було вивчити в експерименті його вплив на функціональний стан ендотелію шляхом оцінки впливу на показники NO-синтазної системи за модельної патології (табл. 2).

У тварин з експериментальною інсулінорезистентністю на 5-й тиждень розвитку патології спостерігалось достовірне підвищення сумарного вмісту нітратів і нітритів (на 26,4 %) та цитруліну (на 27,1 %) при зниженні вмісту аргініну (на 33,5 %), що, ймовірно, було пов'язано з гіперінсулінемією, оскільки відомо, що інсулін – потужний індуктор NO-синтази та стимулює надходження аргініну до клітин. Зазначені зміни свідчать про формування передумов для розвитку порушень функціонального стану ендотелію та розвитку ендотеліальної дисфункції.

Застосування метформіну супроводжувалось змінами сумарного вмісту нітратів і нітритів (достовірно зростання на 15,9 % у порівнянні з інтактними тваринами) та вірогідними – відносно показників нелікованих тварин. На тлі лікування спостерігалось достовірне зростання показника цитруліну (на 15,7 %) та зниження аргініну (на 10,9 %). Механізм такого впливу є не до кінця з'ясованим, проте відомо, що метформін активує цАМФ-залежну протеїнкіназу, яка залучена до експресії ендотеліальної NO-синтази, на користь чого свідчать зміни всіх трьох показників. Крім того, у ряді робіт було показано, що метформін може підвищувати біодоступність NO через універсальні посередники – динітрозильні комплекси феруму та сам виступати донатором NO, на користь чого свідчать більш виразні зміни сумарного вмісту нітратів і нітритів.

Таблиця 2

**ВПЛИВ МЕТФОРМІНУ НА ПОКАЗНИКИ NO-СИНТАЗНОЇ СИСТЕМИ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ У ЩУРІВ (M ± m, n = 10)**

Показники	Інтактний контроль	Модельна патологія	Модельна патологія + метформін
NO ₂ +NO ₃ ⁻ , ммоль/л	122,20 ± 1,23	154,50 ± 1,15*	141,60 ± 2,32*/**
Аргінін, ммоль/л	64,40 ± 0,65	42,80 ± 0,43*	57,40 ± 0,75*/**
Цитрулін, ммоль/л	41,30 ± 1,05	52,50 ± 1,21*	47,80 ± 1,22*/**

Примітки: * – зміни достовірні відносно показників інтактного контролю (p ≤ 0,05); ** – зміни достовірні відносно показників модельної патології (p ≤ 0,05).

ВИСНОВКИ

Застосування метформіну за експериментальної IP у щурів нівелює виразність гіперглікемії та гіперінсулінемії, призводить до зростання сумарного вмісту нітратів/нітритів та цитруліну, незначного, проте вірогідного зни-

ження вмісту аргініну. В цілому зазначені зміни свідчать про клінічно значущий внесок препарату до функціонального стану ендотелію та може пояснювати його благотворний вплив на стан кардіоваскулярної системи за IP.
Конфлікт інтересів: відсутній.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Guo, S. Insulin signaling, resistance, and metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms / S. Guo // *J. of Endocrinol.* – 2013. – Vol. 220, Issue 2. – С. T1–T23. doi : 10.1530/joe-13-0327.
2. Eringa, E. Endothelial dysfunction in (pre) diabetes: characteristics, causative mechanisms and pathogenic role in type 2 diabetes / E. Eringa, E. Serne, R. Meijer // *Rev. in Endocrine and Metabolic Disorders.* – 2013. – Vol. 14, Issue 1. – С. 39–48. doi : 10.1007/s11154-013-9239-7.
3. Jia, G. Endothelial dysfunction potentially interacts with impaired glucose metabolism to increase cardiovascular risk / G. Jia, J. Sowers // *Hypertension.* – 2014. – Vol. 64, Issue 4. – С. 1192–1193. doi : 10.1161/hypertensionaha.114.04348.
4. Endothelial dysfunction in metabolic syndrome: prevalence, pathogenesis and management / K. Tziomalos, V. Athyros, A. Karagiannis, D. Mikhailidis // *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Dis.* – 2010. – Vol. 20, Issue 2. – С. 140–146. doi : 10.1016/j.numecd.2009.08.006.
5. Metformin: from mechanisms of action to therapies / M. Foretz, G. Bruno, B. Luc et al. // *Cell Metabolism.* – 2014. – Vol. 20, Issue 6. – С. 953–966. doi : 10.1016/j.cmet.2014.09.018.
6. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action / G. Zhou, M. Robert, L. Ying et al. // *The J. of Clin. Investigation.* – 2001. – Vol. 108, Issue 8. – С. 1167–1174. doi : 10.1172/jci200113505.
7. Rena, G. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? / G. Rena, R. Ewan, S. Kei // *Diabetologia.* – 2013. – Vol. 56, Issue 9. – С. 1989–1996. doi : 10.1007/s00125-013-2991-0.
8. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism / S. Hawley, E. Anne, S. Grith, H. Grahame // *Diabetes.* – 2002. – Vol. 51, Issue 8. – С. 2420–2425. doi : 10.2337/diabetes.51.8.2420.
9. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview / B. Viollet, G. Bruno, S. Nieves et al. // *Clin. Sci.* – 2012. – Vol. 122, Issue 6. – С. 253–270. doi : 10.1042/cs20110386.
10. Загайко, А. Л. Модифікація методу моделювання експериментальної інсулінорезистентності у щурів : інформ. лист Міністерства охорони здоров'я України / А. Л. Загайко, Т. О. Брюханова, А. І. Шкапо // Український центр наукової медичної інформації та патентно-лицензійної роботи (Укрмедпатентінформ). – К., 2015. – № 86. – 7 с.
11. Matthews, D. Homeostasis model assessment: insulin resistance and b-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man / D. Matthews, J. Hosker, A. Rudenski // *Diabetol.* – 1985. – Vol. 28, Issue 7. – С. 412–419. doi : 10.1007/bf00280883.
12. Колб, В. Справочник по клинической химии / В. Колб, В. Камышников. – Мн : Беларусь, 1982. – 366 с.
13. Лифшиц, В. Биохимические анализы в клинике / В. Лифшиц, В. Сидельников. – Воронеж : Дом ВГУ, 1996. – 280 с.

REFERENCES

1. Guo, S. (2013). Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *Journal of Endocrinology*, 220 (2), T1–T23. doi: 10.1530/joe-13-0327
2. Eringa, E. C., Serne, E. H., Meijer, R. L., Schalkwijk, C. G., Houben, A. J. H. M., Stehouwer, C. D. A., van Hinsbergh, V. W. M. (2013). Endothelial dysfunction in (pre)diabetes: Characteristics, causative mechanisms and pathogenic role in type 2 diabetes. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 14 (1), 39–48. doi: 10.1007/s11154-013-9239-7
3. Jia, G., Sowers, J. R. (2014). Endothelial Dysfunction Potentially Interacts With Impaired Glucose Metabolism to Increase Cardiovascular Risk. *Hypertension*, 64 (6), 1192–1193. doi: 10.1161/hypertensionaha.114.04348
4. Tziomalos, K., Athyros, V. G., Karagiannis, A., Mikhailidis, D. P. (2010). Endothelial dysfunction in metabolic syndrome: Prevalence, pathogenesis and management. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20 (2), 140–146. doi: 10.1016/j.numecd.2009.08.006
5. Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., Viollet, B. (2014). Metformin: From Mechanisms of Action to Therapies. *Cell Metabolism*, 20 (6), 953–966. doi: 10.1016/j.cmet.2014.09.018
6. Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Moller, D. E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *Journal of Clinical Investigation*, 108 (8), 1167–1174. doi: 10.1172/jci200113505
7. Rena, G., Pearson, E. R., Sakamoto, K. (2013). Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia*, 56 (9), 1898–1906. doi: 10.1007/s00125-013-2991-0
8. Hawley, S. A., Gadalla, A. E., Olsen, G. S., Hardie, D. G. (2002). The Antidiabetic Drug Metformin Activates the AMP-Activated Protein Kinase Cascade via an Adenine Nucleotide-Independent Mechanism. *Diabetes*, 51 (8), 2420–2425. doi: 10.2337/diabetes.51.8.2420
9. Viollet, B., Guigas, B., Garcia, N. S., Leclerc, J., Foretz, M., Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science*, 122 (6), 253–270. doi: 10.1042/cs20110386
10. Zahaiko, A. L., Briukhanova, T. O., Shkapo, A. I. (2015). *Ukrainskyi tsentr naukovoi medychnoi informatsii ta patentno-litsenziinoi roboty (Ukrmedpatentinform)*, 86. Kyiv, 7.
11. Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and b-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28 (7), 412–419. doi: 10.1007/bf00280883
12. Kolb, V., Kamysnikov, V. (1982). *Spravochnik po klinicheskoi farmatsii*. Minsk, Belarus, 366.
13. Lifshits, V., Sidelnikov, V. (1996). *Biokhimicheskie analizy v klinike*. Voronezh: Dom VGU, 280.

Відомості про авторів:

Загайко А. Л., д-р біол. н., професор, завідувач кафедри біологічної хімії, Національний фармацевтичний університет.

E-mail: andrey.zagayko@gmail.com. ORCID – <http://orcid.org/0000-0002-2226-976X>

Брюханова Т. О., асистент кафедри біологічної хімії, Національний фармацевтичний університет. E-mail: tatiana.briukhanova@gmail.com.

ORCID – <http://orcid.org/0000-0002-8042-9063>

Information about authors:

Zagayko A. L., d. biol. s., professor, head of the biological chemistry department, National University of Pharmacy. E-mail: andrey.zagayko@gmail.com.

ORCID – <http://orcid.org/0000-0002-2226-976X>

Briukhanova T. O., assistant of the department of biological chemistry, National University of Pharmacy. E-mail: tatiana.briukhanova@gmail.com.

ORCID – <http://orcid.org/0000-0002-8042-9063>

Сведения об авторах:

Загайко А. Л., д-р биол. н., профессор, заведующий кафедрой биологической химии, Национальный фармацевтический университет.

E-mail: andrey.zagayko@gmail.com. ORCID – <http://orcid.org/0000-0002-2226-976X>

Брюханова Т. А., ассистент кафедры биологической химии, Национальный фармацевтический университет.

E-mail: tatiana.briukhanova@gmail.com. ORCID – <http://orcid.org/0000-0002-8042-9063>

Рекомендовано д. біол. н., професором О. І. Набокою

Надійшла до редакції 01.03.2017 р.