

УДК 616.379-008.64:547.7:616-018.1-612.085.1-612.013

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ НАЙБІЛЬШ ПЕРСПЕКТИВНИХ
СПОЛУК З 1,3-ДІАЗАФРАГМЕНТАМИ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ
АПОПТОТИЧНИХ ПРОЦЕСІВ У ПІДШЛУНКОВІЙ ЗАЛОЗІ ЩУРІВ З
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ 2 ТИПУ**

Т. В. Тижненко¹, А. К. Почерняєв², Ю. А. Опалейко³

¹⁻³ДУ «Інститут проблем ендокринної патології імені В. Я. Данилевського НАМН України», вул. Артема 10, Харків, 61002, Україна

Вступ. На теперішній час надзвичайно важливою є проблема широкого розповсюдження захворювань ендокринної системи, перше місце серед яких займає цукровий діабет (ЦД) 2 типу. Це складне полігенне захворювання, патогенетичну основу якого складають, головним чином, інсулінорезистентність та дисфункція β -клітин підшлункової залози. Крім того, існують відомості щодо участі апоптозу у розвитку ЦД 2 типу [1], а також його визначальної ролі при виникненні та прогресуванні деяких серцево-судинних захворювань [2, 3]. Саме тому, актуальним є вивчення впливу нових антидіабетичних сполук на клітини підшлункової залози при експериментальному ЦД 2 типу на підставі вивчення особливостей виразності рівня їх апоптозу.

Мета. Дослідження впливу найбільш перспективних сполук з 1,3-діазафрагментами на інтенсивність апоптотичних процесів у підшлунковій залозі щурів з експериментальним ЦД 2 типу.

Матеріали та методи. Моделювання ЦД 2 типу у статевозрілих (6-місячних) самців-щурів лінії Вістар проводили шляхом внутрішньочеревного введення дексаметазону (фірма «KRKA», Словенія) в дозі 1 мг/кг маси тіла протягом 11 діб, починаючи з 25 доби 35 добового утримання тварин на високожировому раціоні харчування (дієта з надмірним вмістом насичених жирів: білки – 15 %, жири – 50 %, вуглеводи – 35 %) [4, 5], з вільним доступом до води та природною зміною режиму освітлення, температура та вологість повітря – за стандартами віварію. Контрольна група відповідної статі та віку споживала стандартне харчування (білки – 15 %, жири – 5 %, вуглеводи – 80 %) та утримувалася в аналогічних умовах. Досліджувані речовини (2506, 2418, 2419, 2420, AD-0407, AD-0111), які були відібрані за даними попереднього фармакологічного скринінгу (практично нетоксичні речовини – 5 клас токсичності) і проявляли виразні властивості відносно нормалізації вуглеводного та ліпідного обміну, вводили діабетичним щурам (n=15) перорально в дозі 50 мг/кг за допомогою зонду у вигляді водної суспензії з Твіном-80 щоденно протягом 10 діб, починаючи з 25 доби експерименту. Контрольна група (n=5) за

аналогічною схемою отримувала плацебо – 3-5 % тонкодисперсну водну емульсію Твіну-80. В якості препарату порівняння використовували метформін в дозі 50 мг/кг маси тіла (мінімальна доза з максимальним терапевтичним ефектом) за аналогічною схемою. Знеживлення тварин проводили шляхом транслокації шийних хребців через 24 год після початку експерименту. Апоптозогенну дію досліджуваної речовини оцінювали використовуючи гомогенат підшлункової залози. Фрагментацію ДНК визначали методом електрофорезу ДНК в агарозному гелі за показником кінцевого етапу деградації хромосомної ДНК. Одна з апоптотичних подій реалізується в ядрі клітини і полягає у фрагментації ДНК. Деградація ДНК є термінальною фазою апоптозу. В ході деградації ДНК спочатку відбувається утворення крупних фрагментів, а далі настає міжнуклеосомна деградація з формуванням фрагментів, що містять близько 180 пар нуклеотидів (п.н.) або кратних їм за величиною. Саме ці фрагменти виявляються у вигляді «драбинки» при електрофорезі ДНК лізатів апоптотичних клітин [6].

Результати. У підшлунковій залозі групи «Інтактний контроль» апоптоз ідентифікується за утворенням високомолекулярних фрагментів завдовжки 10000-5000 п.н., що свідчить про інтенсивність процесів апоптозу, притаманну здоровому організму. У групі діабетичних щурів, що отримували плацебо, спостерігалась значна стимуляція апоптозу клітин підшлункової залози, а саме, «драбинка» ДНК починається з утворення фрагментів завдовжки 500-250 п.н., що говорить про яскраво виражений апоптотичний процес. У зразках підшлункової залози щурів з експериментальним ЦД 2 типу, які отримували препарат порівняння метформін, апоптоз починається з утворення високомолекулярних фрагментів завдовжки 7000-4000 п.н., що говорить про апоптоз, близький до рівня здорового організму. У групах, які отримали речовини 2418 та AD-0407, апоптоз починається з утворення високомолекулярних фрагментів завдовжки 5000-3000 п.н., що говорить про апоптоз, також близький до неураженого організму. У зразках підшлункової залози діабетичних тварин, які отримували сполуку 2506, верифікується менш виразний стан апоптозу у порівнянні зі зразками груп, які отримували плацебо, але більш помітний, ніж у попередніх експериментальних групах, так, ДНК підшлункової залози деградована на рівні від 3500 до 2500 пар нуклеотидів. Цей факт, можливо, свідчить про те, що речовині 2506 також не притаманна токсичність відносно панкреатичних β -клітин. У щурів, які отримували речовини 2419 та 2420, апоптоз починався з утворення фрагментів завдовжки 2000-1500 п.н, що свідчить про більш виразну апоптотичну загибель панкреатичних клітин. У діабетичних тварин, що споживали речовину AD-0111 спостерігалось розщеплення ДНК на фрагменти 500-200 п.н., що говорить про яскраво виражений

апоптозотичний процес, властивий діабетичним тваринам без терапевтичного впливу.

Висновки. Наші дослідження показали, що ДНК клітин підшлункової залози, у щурів, які отримували метформін і речовини 2506, 2418, AD-0407, деградована менше, ніж у тварин з експериментальним ЦД 2 типу. Оскільки деградація ДНК органо-специфічна і залежить від виду патології, можна припустити, що феномен деградації ДНК і нуклеотидні послідовності деградованих фрагментів ДНК є своєрідними і відображають даний фізіологічний стан організму, передуючи процесу апоптозу, тобто у тварин з діабетом спостерігається стимуляція апоптозу в порівнянні з контролем. Вивчення вищезгаданих деградованих фрагментів ДНК та ідентифікація нуклеотидних послідовностей можуть служити ключовим підходом в пізнанні молекулярно-біологічних процесів патологій на рівні ДНК. Вивчення ролі апоптозу у формуванні і розвитку ЦД дозволить істотно доповнити вже існуючі уявлення щодо генезу цієї патології та визначити нові підходи до його профілактики й терапії.

Література

1. Glucose Induces Pancreatic Islet Cell Apoptosis That Requires the BH3-Only Proteins Bim and Puma and Multi-BH Domain Protein Bax [Text] / M. D. McKenzie, E. Jamieson, E. S. Jansen [et al.] // Diabetes. – 2010. – Vol. 59(3). – P. 644–652.
2. Ащеулова, Т. В. Дистанційні маркери апоптозу при артеріальній гіпертензії [Текст] / Т. В. Ащеулова, О. М. Ковальова // Журн. АМН України. – 2007. – Т. 13, № 2. – С. 319–325.
3. Ащеулова, Т. В. Прозапальні цитокіни, апоптоз: зв'язок зі структурно-функціональними параметрами гіпертензивного серця [Текст] / Т. В. Ащеулова // Медицина сьогодні і завтра. – 2007. – № 2. – С. 59–63.
4. Пат. 53262 Україна, МПК (2009) G09B 23/00. Спосіб комбінованого моделювання цукрового діабету 2 типу у щурів [Текст] / О. І. Гладких, Ж. А. Лещенко, В. В. Полторак [та ін.] (UA) ; заявник і патентовласник Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського АМН України» (UA). – № u 201005316; заявл. 30.04.10; опубл. 27.09.10, Бюл. № 18. – 4 с.
5. Relationship between visceral adiposity and intramyocellular lipid content in two rat models of insulin resistance [Text] / M. Korach-Andre, J. Gao, J. S. Gounarides [et al.] // Amer. J. Physiol.: Endocrinol. Metabol. – 2005. – Vol. 288. – P. 106–116.
6. Данченко, Е. О. Лабораторні методи оцінки апоптозу і некрозу [Текст] / Е. О. Данченко // Мед. панорама (Лаб. медицина). – 1999. – № 3. – С. 18–19.