

В. А. Кузнецова, О. А. Соловьева, А. И. Мацевич, А. А. Спасов

Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармакологии

МЕТОД ОЦЕНКИ АНТИГЛИКИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ *IN VITRO* НОВЫХ ВЕЩЕСТВ

УДК 615.015:547.77

В ходе исследования была воспроизведена реакция гликирования *in vitro*. Известный ингибитор неферментативного гликозилирования аминогуанидин проявил дозозависимое антигликирующее действие. По результатам эксперимента показано, что данная модель может быть использована для поиска новых ингибиторов реакции Майяра.

Ключевые слова: антигликирующая активность, аминогуанидин, сахарный диабет.

V. A. Kuznetsova, O. A. Solovyova, A. I. Matsevich, A. A. Spasov

EVALUATION OF *IN VITRO* ANTIGLYCATION ACTIVITY OF NOVEL SUBSTANCES

A glycation reaction was reproduced *in vitro*. Aminoguanidine, a well-known nonenzymatic glycosylation inhibitor, demonstrated a dose-dependent antiglycation effect. The results of the experiment have shown that this model can be used to search for new Maillard reaction inhibitors.

Keywords: antiglycation activity, aminoguanidine, diabetes mellitus.

Неферментативная реакция между свободными аминокетильными группами белков и карбонильными группами восстановленных сахаров и других карбонильных соединений известна как реакция Майяра, названная так в честь Louis-Camille Maillard, который в 1912 г. первым обнаружил и описал коричнево-окрашенные конечные продукты реакции глюкозы с аминокетильной группой глицина [6]. Данная реакция протекает в несколько этапов. На ранней стадии глюкоза (или другие восстановленные сахара) реагирует со свободной аминокетильной биологических аминов с образованием нестабильного соединения, основания Шиффа, которое подвергается перегруппировке до более стабильного вещества известного как продукт Амадори. В поздней стадии гликирования необратимые соединения, называемые конечными продуктами усиленного гликозилирования (КПГ), формируются за счет реакций окисления, дегидратации и циклизации [12].

Процесс гликирования, усиливающийся при гипергликемии, лежит в основе патогенеза микро- и макрососудистых осложнений сахарного диабета (СД) [1]. КПГ влияют на коллаген типа IV, миелин, тубулин, активатор плазминогена-1, фибриноген. Рецептор-зависимые эффекты КПГ опосредованы их взаимодействием со специфическими рецепторами, что приводит к активации ядерного фактора NF-κB, который перемещается в ядро и приводит к повышению транскрипции молекул межклеточной адгезии-1, E-селектина, эндотелина-1, сосудистого эндотелиального фактора роста, провоспалительных цитокинов [4].

Первым и наиболее изученным веществом, ингибирующим гликирование белков, является аминогуанидин, который предотвращает формирование КПГ [9]. Однако клинические испытания данного препарата были остановлены в связи с его недостаточной эффективностью и наличием побочных эффектов (гастроинтестинальные симптомы, волчаночно-подобный, гриппоподобный синдромы, васкулит [3], анемия [2]). Антигликирующая активность выявлена у пиридоксамина, гидразиновых производных тиазолидина [9] и карбоксимидамида [13], имеющие структурное сходство с аминогуанидином, производные феноксиизомасляной кислоты [11]. Все вышеперечисленное обуславливает актуальность поиска веществ, предотвращающих образование КПГ, с целью создания лекарственных препаратов для патогенетической профилактики осложнений СД.

В настоящее время существует большое количество разнообразных методов моделирования реакции Майяра *in vitro*. Например, методические подходы, связанные с определением конечных продуктов гликирования, образовавшихся в результате реакции между модельным белком (бычий сывороточный альбумин, человеческий сывороточный альбумин) и сахарами (глюкоза, фруктоза, рибоза) или дикарбонильными веществами (глиоксаль, метилглиоксаль) [10, 7], часто используют для поиска новых ингибиторов неферментативного гликозилирования. Наиболее часто для регистрации КПГ в реакционной смеси используют метод определения специфической флуоресценции гликированных белков при длине волны возбуждения/испускания 370/440 нм [8].

* Работа была выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда (проект №14-25-00139).

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Воспроизвести реакцию Майяра *in vitro* для оценки антигликирующей активности новых соединений.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Реакцию гликирования воспроизводили по методу [5]. Конечный объем реакционной смеси составлял 1,5 мл. Реакционная смесь содержала растворы бычьего сывороточного альбумина (1 мг/мл) и глюкозы (500 мМ) в фосфатном буфере (рН 7,4).

Для оценки адекватности воспроизведения метода использовали аминогуанидин, раствор которого добавляли в экспериментальные образцы в различных концентрациях в объеме 50 мкл. В контрольные пробы добавляли фосфатный буфер в аналогичном объеме. Для предупреждения бактериального роста в буферный раствор вносили азид натрия в конечной концентрации 0,02 %. Все экспериментальные образцы инкубировали в течение 24 часов при 60 °С.

По истечении срока инкубации проводили определение специфической флуоресценции гликированного бычьего сывороточного альбумина на спектрофлуориметре MPF-400 (Hitachi,

Япония) при длине волны возбуждения 370 нм и испускания 440 нм.

Обработку полученных данных проводили с использованием табличного редактора Microsoft Excel 2007 и непараметрических методов статистики в программе GraphPad Prism (версия 5.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование КПГ подтверждается наличием характерного пика флуоресценции контрольных образцов при длинах волн возбуждения/испускания 370/440 нм. В ходе проведенных исследований была подтверждена антигликирующая активность аминогуанидина, которая носила дозозависимый характер (см. рис.). Было показано, что аминогуанидин снижал гликирование БСА в концентрации 1 мМ; 0,5 мМ и 0,1 мМ на 70, 54 и 7 % соответственно. На основании полученных данных, был рассчитан показатель IC₅₀, который составил 459 мкМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, воспроизведенная модель является адекватной и может служить для оценки антигликирующей активности соединений и поиска новых ингибиторов реакции Майяра.

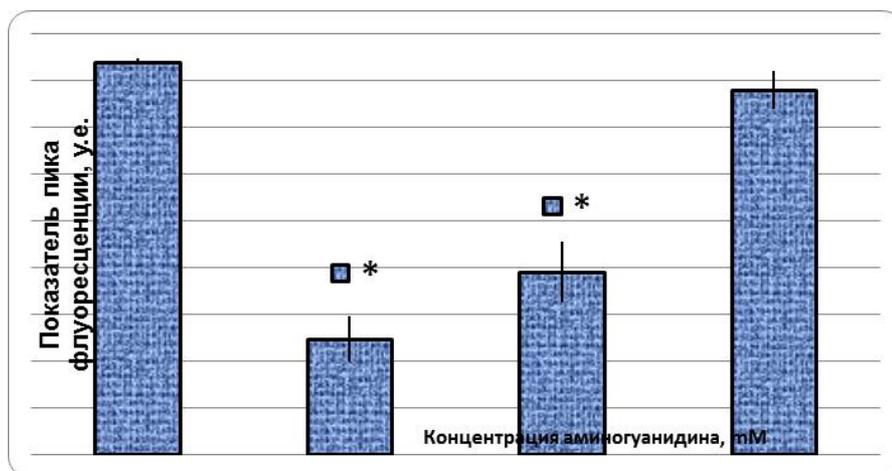


Рис. Антигликирующая активность аминогуанидина:

* – данные достоверны по отношению к контролю ($p < 0,01$), U-критерий Манна–Уитни

ЛИТЕРАТУРА

1. Шестакова М. В., Шамхалова М. Ш., Ярек-Мартынова И. Я. и др. // Сахарный диабет. – 2011. – №1. – С. 81–88.
2. Bolton W. K., Cattran D. C., Williams M. E., et al. // Am. J. Nephrol. – 2004. – Vol. 24. – P. 32–40.
3. Freedman B. I., Wuertth J.-P., Cartwright K., et al. // Control. Clin. Trials – 1999. – Vol. 20 (5). – P. 493–510.
4. Goh S.-Y., Cooper M. E. // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2008. – Vol. 93 (4). – P. 1143–1152.
5. Jedsadayamata A. // Naresuan University Journal. – 2005. – Vol. 13 (2). – P. 35–41.
6. John W. G., Lamb E. J. // Eye. – 1996. – Vol. 7. – P. 230–237.

7. Luers L., Rysiewski K., Dumpitak C., et al. // Rejuvenation Research. – 2012. – Vol. 15 (2). – P. 201–205.
8. Matsuura N., Aradate T., Sasaki C., et al. // J. Health. Sci. – 2002. – Vol. 48. – P. 520–526.
9. Peyroux J., Sternberg M. // Pathologie Biologie. – 2006. – Vol. 54. – P. 405–419.
10. Rahbar S., Yermeni K. K., Scott S., et al. // Mol. Cell. Biol. Res. Commun. – 2000. – Vol. 3. – P. 360–366.
11. Rahbar S., Figarola J. L. // Archives of Biochemistry and Biophysic. – 2003. – Vol. 419 (1). – P. 63–79.
12. Singh V. P., Bali A., Singh N., et al. // Korean J. Physiol. Pharmacol. – 2014. – Vol. 18. – P. 1–14.
13. Wilkinson-Berka J. L., Kelly D. J., Koerner S. M., et al. // Diabetes. – 2002. – Vol. 51. – P. 3283–3289.