

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ТЕХНОЛОГІЙ ТА
ДИЗАЙНУ

Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій

(повне найменування інституту/факультету)

Кафедра промислової фармації

(повна назва кафедри)

РЕФЕРАТ

до дипломної магістерської роботи

на тему

«Пошук нових підходів для створення лікарських засобів з антидіабетичною
дією»

Виконала: студентка групи МгЗХФ-19
спеціальності 226

Фармація, промислова фармація

(шифр і назва спеціальності)

Цимбал Л. В.

(прізвище та ініціали)

Керівник Кулик В.Б.

(прізвище та ініціали)

Рецензент Харитоненко Г.І.

(прізвище та ініціали)

Київ – 2020

Актуальність теми

Широка географічна поширеність цукрового діабету, рання інвалідизація хворих працездатного віку і висока смертність від прогресуючих ускладнень. А також швидка динаміка поширення захворювання в світі, Всесвітня Діабетична Федерація прогнозує, що число хворих на ЦД до 2045 р. зросте в 1,5 рази і досягне 629 мільйонів чоловік.

Класична цукрознижувальна терапія має численні недоліки, в тому числі побічні ефекти щодо нервової, серцево-судинної, травної систем. Тому пошук принципово нових мішеней для створення антидіабетичних засобів залишається вкрай актуальним. Дія більшості застосовуваних до теперішнього часу антидіабетичних препаратів була направлена в основному на підвищення секреції інсуліну і його ефективності, а також на поглинання глюкози. Однак, згідно з уявленнями, які отримують розвиток останнім часом, етіотропна терапія ЦД 2 типу повинна базуватися на застосуванні речовин, які запобігають втраті і збільшують виживання β -клітин, не надаючи при цьому токсичних ефектів щодо інших органів.

Мета дослідження полягала в оцінці цитопротекторної активності щодо панкреатичних β -клітин оригінальних сполук з нейропротекторними властивостями в умовах моделі ЦД 2 типу та зіставлення вираженості антидіабетичного ефекту на функціональному і морфологічному рівнях.

Завдання дослідження:

1. Вивчити антидіабетичну і захисну дію солей літію (хлориду, карбонату) на моделі стрептозотоцин (СТЗ) -індукованного ЦД 2 типу з морфологічним аналізом β -клітин підшлункової залози тварин експериментальних груп.

2. Вивчити антидіабетичну і захисну дію Афобазолу на моделі СТЗ-індукованого ЦД 2 типу з морфологічним аналізом β -клітин підшлункової залози тварин експериментальних груп.

3. Вивчити антидіабетичну і захисну дію еталонного антидіабетичного препарату метформіну на моделі СТЗ-індукованого ЦД 2 типу з морфологічним аналізом β -клітин підшлункової залоз тварин.

4. Оцінити кореляцію між ступенем антигіперглікемічного ефекту і виразністю захисної дії за показниками абсолютного і відносного числа інсулін-позитивних β -клітин в підшлунковій залозі.

Об'єкт дослідження: антигіперглікемічний та цитопротекторний ефекти солей літію та афобазолу.

Предмет дослідження – пошук перспективних фармацевтичних стратегій для лікування цукрового діабету.

Для досягнення мети і розв'язання поставлених завдань використано такі **методи дослідження:** визначення рівня глюкози в крові тварин, визначення толерантності до інсулінового навантаження, кількісне визначення малонового деальдегіду, імуногістохімічне дослідження підшлункової залози, статистична обробка результатів.

ЦД 2 типу моделювали шляхом одноразового введення СТЗ в дозі 45 мг / кг в / оч, попередньо розчиненого в холодному цитратному буфері, рН = 4,5. Через 72 години після ін'єкції проводили кількісне визначення глюкози в крові. В подальший експеримент включали тварин, у яких рівень глюкози був не менше 12-15 ммоль / л.

Експерименти проводилися на наступних групах тварин:

- 1) Група пасивного контролю: введення фізіологічного розчину (ФР) в / оч або перорально в обсязі 10 мл / кг щодня протягом 28 днів;
- 2) Група активного контролю: введення СТЗ; починаючи з 3-го дня після введення СТЗ - введення ФР в / оч або перорально в обсязі 10 мл / кг щодня протягом 28 днів;
- 3) Експериментальна група: введення СТЗ; починаючи з 3-го дня після введення СТЗ - введення досліджуваного препарату в / оч або перорально щодня протягом 28 днів.

Препарати і речовини, що використовуються в експериментах

1. Діабетогенний токсин СТЗ (Sigma, США) в дозі 45 мг / кг.
2. Антидепрессант з нейропротекторними властивостями літію хлорид (Sigma, США) застосовувався в дозі 10 мг / кг в / оч.
3. Антидепрессант з нейропротекторними властивостями літію карбонат (Фармстандарт, Росія) використовувався в дозі, еквінормальній 10 мг / кг літію хлориду в перерахунку на іон літію (8,9 мг / кг речовини) в / оч.
4. Анксиолітичний і нейропротекторний препарат афобазол (5-етокси 2- [2-(морфоліно) етілтію] бензimidазолу дигідрохлорид), використовувався в дозі 0,1 мг / кг в / оч і 10 мг / кг перорально.
5. Антидіабетичний препарат метформін (Сиофор, Berlin-Chemie Menarini, Німеччина) використовувався в дозі 300 мг / кг перорально.
6. Інсулін рекомбінантний (Рінсулін, Герофарм, Росія).

Тварини

Дослідження виконані на самцях білих щурів Wistar (n = 100) з початковою масою тіла 250 - 300 г, отриманих з віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАНУ. Щури мали вільний доступ до корму (за винятком 16 год, що передують введенню СТЗ і тесту толерантності до інсуліну) та питної води.

Визначення рівня глюкози проводили за допомогою глюкометра One Touch Ultra (USA) в крові, взятої з хвостової вени щурів в 1, 7, 14, 21, 28 дні введення препаратів (з третього дня після введення СТЗ). Проби для визначення базального рівня глюкози забирали через 2 години після введення досліджуваних речовин.

Для порівняльної характеристики динаміки і вираженості ефекту досліджуваних речовин був розрахований відносний показник антигіперглікемічної активності (Аг) за формулою:

$$A_g = \frac{[ГЛК \text{ (акт. Контр.)} - ГЛК \text{ (р-на)}] \times 100\%}{[ГЛК \text{ (акт. Контр.)} - ГЛК \text{ (пас. Контр.)]}$$
, Де ГЛК (акт. Контр.) - рівень глюкози в плазмі крові в групі СТЗ та ФР, ГЛК (р-на) - рівень глюкози в групах СТЗ і досліджувана речовина, ГЛК (пас. контр.) - рівень глюкози у тварин, яким вводився ФР.

Визначення маси тіла експериментальних тварин проводили початково (за 3 дні до введення СТЗ), а також кожні три дні протягом усього періоду введення препаратів. Зважування кожної тварини займає 5-10 хвилин від посадки щура в чашу терезів до отримання стабільних значень на електронному табло протягом 2 хвилин.

Визначення споживання корму і води проводили щодня протягом усього періоду введення препаратів, розраховуючи середні показники на 1 щура в кінці кожного тижня експерименту виходячи з їх кількості в кожній клітці.

В експериментах з профілактичним введенням ГК-2, в яких через 3 дні після введення СТЗ рівень глікемії становив 7-9 ммоль / л, а в подальшому наростав, тобто мав місце розвивиток ЦД 2 типу досліджували реакцію на введення інсуліну для оцінки рівня ІР. За 18 годин до проведення тесту інсулінової навантаження щурам обмежували доступ до корму при вільному доступі до води. Інсулін вводили в дозі 0,4 МО / кг підшкірно. Зразки крові для визначення концентрації глюкози відбирали з хвостової вени безпосередньо перед (0) і через 45 хв після введення інсуліну.

Після закінчення експерименту тварин декапітували, кров із сонної артерії відбирали для визначення МДА, а підшлункові залози видаляли для подальшого морфологічного дослідження.

Для визначення МДА до 50 мкл плазми додавали 20 мкл 0,485 М солі Мора і інкубували при 37 ° С протягом 30 хв. Потім до зразків додавали 1030 мкл 0,9% розчину 2-тіобарбітурової кислоти (Serva, Німеччина) в 50% оцтової кислоти і інкубували при 80 ° С протягом 60 хв. Після охолодження вимірювали оптичну

щільність зразків на спектрофотометрі DU-50 (Beckman-Coulter, США) в напівмікрокуветі при 532 нм. Розрахунок кількості МДА проводили на підставі значення коефіцієнта молярної екстинкції $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Всі вимірювання проводили в 3-х паралелях.

Імуногістохімічне дослідження підшлункової залози

Підготовка препаратів

Для ІГА острівкового апарату підшлункові залози щурів експериментальних груп фіксували в 10% нейтральному формаліні (pH = 7,4) (Sigma, США). Зневоднення зразків проводили в висхідному ряду спиртів (70%, 70%, 95%, 100%, 100%) і ксилолі (протягом 1 години в кожному розчиннику), після чого заливали в парафінові блоки.

Парафінові зрізи товщиною 5 мкм виконували на мікротомі (Micritome Jung RM2035, Німеччина). З кожного блоку отримували по 15-20 поперечних зрізів з різних відділів підшлункової залози, поміщали їх на скло, оброблені полі-L-лізином (Menzel-Glaser, 76×26 мм). Підготовлені мікропрепарати (по 4-5 зрізів на скло) сушили на сухій бані при температурі 40° протягом 60 хв, після чого використовували для дослідження.

Перед нанесенням антитіл мікропрепарати депарафінували в двох змінах ксилолу і гідратованих в низхідному ряду спиртів (95%, 95%, 70%, 70%) по 10 хв, після чого промивали у фосфатному буфері PBS (Sigma, США) (10 хв). З метою блокади ендогенних пероксидаз, здатних вступити в реакцію з детектуючим агентом, мікропрепарати протягом 10 хв обробляли 3% розчином перексиду водню.

Імуногістохімічна реакція

Для запобігання неспецифічного фонового фарбування за допомогою зв'язування первинних антитіл з компонентами тканини мікропрепарати інкубували з 10% розчином нормальної козячої сироватки (Normal Goat Serum, Abscam, Великобританія) протягом 1 год при кімнатній температурі. Далі зрізи обробляли первинними моноклональними антитілами до інсуліну, отриманими від морських свинок (anti-insulin GP 1: 500, Abscam, Великобританія). Як

середовище для розведення антитіл використовували фосфатний буфер. Оброблені мікропрепарати залишали на 24 год у вологій камері при температурі 2-4 ° С.

Для візуалізації результатів імуногістохімічної реакції мікропрепарати інкубували з вторинними кролячими антитілами, міченими пероксидазою (anti-GP Rabbit 1: 500, Abcam, Великобританія) протягом 1 год при кімнатній температурі з подальшим використанням діамінобензидина (ДАБ) (DAB Vector Peroxidase, США). Готові мікропрепарати збезводнювали в висхідному ряду спиртів і ксилолу і уклали в середовище Eukitt (Panreac, Іспанія). Достовірність результатів дослідження досягалася використанням негативних контролів антигенів та антитіл.

Мікроскопічний аналіз

Морфометричне дослідження проводили з використанням мікроскопа Aristoplan (Leitz, Німеччина) з цифровою камерою DCM-800 (Мікромед, Росія), персонального комп'ютера і програмного забезпечення ScorePhoto при збільшенні x40 й x640.

Виходячи з літературних даних про неоднорідність реакції β-ендокриноцитів на шкідливу дію СТЗ, нами було запропоновано диференціювати острівці β-клітин на групи в залежності від площі (менше 500 мкм², 501-2500 мкм², 2501-10000 мкм², більш 10001 мкм²), визначаючи процентний вміст кожної групи від загального числа острівців. Для цього розраховували кількість острівців, площа інсулін-продукуючих β-клітин в абсолютних одиницях і відношення їх площі до загальної площі мікропрепарату в полі зору.

З метою порівняння вираженості цитопротекторної активності (ЦПА) речовин у % β-клітин в мікропрепараті підшлункової залози щурів був розрахований відносний показник ЦПА за формулою:

$$\text{ЦПА} = [\text{ЦПА (акт. Контр.)} - \text{ЦПА (р-на)}] \times 100\% / [\text{ЦПА (акт. Контр.)} - \text{ЦПА (пас. Контр.)}]$$
, Де ЦПА (акт. Контр.) -% β-клітин в поперечному зрізі підшлункової залози щурів групи СТЗ та ФР, ЦПА (р-на) -% β-клітин в поперечному зрізі підшлункової залози щурів групи СТЗ і досліджувана речовина, ЦПА (пас.

Контр.) -% β -клітин в поперечному зрізі підшлункової залози щурів, яким вводився ФР.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми Biostat. Характер розподілу отриманих даних визначали за критерієм Шапіро-Уїлкі. Статистичну значимість відмінностей між групами оцінювали тестом ANOVA (при нормальному розподілі даних) або з використанням критерію Манна-Уїтні (при розподілі, відмінному від нормального). Розраховували середнє арифметичне значення M і стандартну похибку середнього арифметичного, SEM (m). Різниця середніх показників вважалася достовірною при $p < 0,05$. Для оцінки взаємозв'язку кількісних ознак використовувався метод рангової кореляції Спірмена.

Практичне значення:

Сукупність отриманих результатів підтверджує висловлену раніше гіпотезу, згідно з якою сполуки, які мають нейропротекторну активність за рахунок ослаблення окисного стресу, здатні надавати захисний ефект також щодо β -клітин. Це створює необхідну основу для пошуку і розробки нових антидіабетичних засобів, дія яких спрямована на відновлення кількості активних β -клітин.

Виявлена здатність вивчених сполук проявляти поряд з основним фармакологічним ефектом гіпоглікемічну активність і захист інсулін-продукуючих β -клітин в умовах СТЗ-індукованого ЦД 2 типу визначає доцільність подальшого вивчення їх антидіабетичного потенціалу, в тому числі і в клінічній практиці.

Висновки:

1. Вивчені солі літію ((хлорид і карбонат) в еквінормальних дозах за вмістом іону літію (10 і 8,9 мг / кг в / оч відповідно)) знижують гіперглікемію, поліфагію і полідипсію, а також рівень МДА в плазмі крові на моделі СТЗ-індукованого ЦД 2

типу. Солі літію мають виражену захисну активність щодо панкреатичних β -клітин.

2. Афобазол в дозі 10 мг / кг (перорально) володіє гіпоглікемічною дією, що зберігається після відміни терапії. Афобазол захищає β -клітини від панкреатоксичної дії СТЗ, що проявляється в збереженні їх числа, відновленні співвідношення ostrivciv velikih i drіbnih rozmiriv i zбільшенні їх середньої площі.

3. Ефективність афобазолу щодо гіперглікемії, полідипсії і динаміки маси тіла порівнянна з такою для еталонного антидіабетичного препарату метформіну (300 мг/кг в/оч). За показником цитопротекції β -клітин, зазначена речовина перевершує активність препарату порівняння.

4. Виявлено наявність кореляційних зв'язків між ступенем антигіперглікемічного та цитопротекторного ефектами, що найбільш виражений для афобазолу.

Отже фармакологічні властивості досліджених сполук відносно інсулін-продукуючих β -клітин в умовах СТЗ-індукованого ЦД 2 типу визначають доцільність подальшого вивчення їх антидіабетичного потенціалу, з метою застосування цих речовин в клінічній практиці у перспективі.

Рекомендації щодо використання одержаних результатів.

Результати дослідження можуть бути використані підприємствами, що займаються розробкою та виробництвом ліків, оскільки ситуація з захворюваністю на цукровий діабет є дуже гострою та розвивається досить швидко. Це може слугувати подальшим розвитком підприємства та підвищенням рівня життя в цілому світі. У сучасних умовах ефективне лікування цукрового діабету є важливим завданням, від рішення якого залежить життя мільйони життів.

Структура та обсяг роботи. Робота складається із вступу, чотирьох розділів, висновків до розділів і загальних висновків та списку використаних джерел. Загальний обсяг роботи – 106 сторінок, основна частина – 85 сторінок. Список використаних джерел становить 151 найменування.

Публікації: основні результати дипломної магістерської роботи відображені у статті *«Пошук нових фармацевтичних стратегій у терапії цукрового діабету II типу»* [стаття прийнята до друку].

Ключові слова: цукровий діабет, солі літію, афобазол, метформін, антиглікемічний та цитопротекторний ефекти.