

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РИВАРОКСАБАНА НА УРОВЕНЬ ГЛЮКОЗЫ У КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Ринейская О. Н.

*Кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой биоорганической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
ryneiskaya@mail.ru*

Лахвич Ф. Ф.

*Кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры биоорганической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
lakhvichtt@gmail.com*

Глинник Станислава Владимировна

*Кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры биоорганической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск,
ryneiskaya@mail.ru*

Аннотация. Целью исследования явилась валидация *in silico* модели связывания Ривароксабана с гексокиназой IV в опыте *in vivo*, в котором было изучено влияние Ривароксабана на уровень глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом. Установлено, что при эндогастральном введении водного раствора Ривароксабана в дозе 300 мг/кг наблюдается нормализация уровня глюкозы крови экспериментальных животных. Это подтверждает валидность модели эксперимента *in silico*, в котором Ривароксабан характеризуется высокой аффинностью к гексокиназе IV.

Ключевые слова: аллоксановый диабет; аффинность; гексокиназа IV; молекулярный докинг; Ривароксабан

STUDY OF THE EFFECT OF RIVAROXABAN ON THE GLUCOSE LEVEL IN RATS WITH ALLOXAN DIABETES

Lakhvich T. T.

*Ph.D. in Chemistry, Associate Professor of Bioorganic Chemistry Department of Belarusian State Medical University, Minsk
lakhvichtt@gmail.com*

Ryneiskaya V. M.

*Ph.D. in Medicine, Head of Bioorganic Chemistry Department of Belarusian State Medical University, Minsk
ryneiskaya@mail.ru*

Annotation. *The research objective was to validate the in silico model of Rivaroxaban binding to hexokinase IV in an in vivo experiment that examined the effect of Rivaroxaban on blood glucose levels in rats with alloxan diabetes. It has been found that endogastrical administration of an aqueous solution of Rivaroxaban at a dose of 300 mg/kg normalizes the blood glucose levels in experimental animals. This confirms the validity of the in silico experimental model, in which Rivaroxaban is characterized by high affinity to hexokinase IV.*

Keywords: *affinity, alloxan diabetes, hexokinase IV, molecular docking, Rivaroxaban.*

Гексокиназа IV (глюкокиназа) является одной из изоформ гексокиназы [1] и играет важную роль в гомеостазе глюкозы; регулирует ее метаболизм в инсулинпродуцирующих бета-клетках поджелудочной железы, гепатоцитах и некоторых клетках нервной системы [2]. В отличие от других гексокиназ глюкокиназа участвует в процессе фосфорилирования глюкозы только после достижения определенной концентрации последней [3]. Мутации гена глюкокиназы GSK вызывают аутосомно-доминантную гиперинсулинемическую гипогликемию и гипоинсулинемическую гипергликемию [4], что свидетельствует о важной роли гексокиназы IV в регуляции углеводного метаболизма. Это создаёт предпосылки для выбора данного фермента в качестве потенциальной мишени для разработки гипогликемических лекарственных средств (ЛС).

Цель работы - исследование влияния Ривароксабана на уровень глюкозы крови крыс с экспериментальным диабетом и сравнение полученных результатов с данными эксперимента *in silico*.

Материалы и методы. Экспериментальные животные (белые беспородные крысы-самцы массой 230-250 г.) были разделены на 4 группы по 10 крыс в каждой: группа 1 – чистый контроль, группа 2 – контроль ривароксабана, группа 3 – крысы с сахарным диабетом (аллоксановая модель), группа 4 – крысы с СД, получающие ривароксабан. У всех крыс определяли уровень глюкозы в крови при помощи портативного измерителя концентрации глюкозы «Сателлит экспресс». Экспериментальный сахарный диабет был индуцирован животным третьей (СД) и четвертой групп (СД + Ривароксабан) путем внутрибрюшинного введения аллоксана в дозе 100 мг/кг однократно. Контроль содержания глюкозы в крови проводился в течение 10-ти дней ежедневно, начиная с 3-го дня после введения аллоксана. Ривароксабан вводился экспериментальным животным групп 2 и 4 в дозе 300 мг/кг внутривентрикулярно один раз в сутки в течение 14-ти дней. По окончании эксперимента животные умерщвлялись под тиопенталовым наркозом (5% раствор тиопентала вводился внутривентрикулярно по 0,3 мл каждой

крысе). Статистический анализ полученных данных осуществляли с помощью программного пакета Statistica 10.0. Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения ($\text{Mean} \pm \text{sd}$). Для анализа межгрупповых различий был использован критерия Манна-Уитни при $p < 0,05$.

Трехмерная структура белка (код 4RCH [5]) получена с ресурса Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>). Молекулярный докинг и визуализацию сгенерированных комплексов проводили с помощью программных пакетов ChemOffice, AutoDock Tools 1.5.7, PyMOL, OpenBabelGUI, онлайн-сервера Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) и Protein-Plus (<https://proteins.plus>).

Результаты. В эксперименте *in silico* было показано, что Ривароксабан имеет высокую аффинность к аллостерическому центру глюкокиназы. При этом минимальное значение энергии связывания Ривароксабана $-9,41$ ккал/моль найдено для стыковки в пределах того же кармана (аллостерического центра), что и для изученных ранее активаторов глюкокиназы [5]. Нами более детально проанализированы два кластера, которые характеризуются близкой топологией связывания. Информация о взаимодействиях между атомами лиганда и остатками АК протеина представлена на рисунке 1.

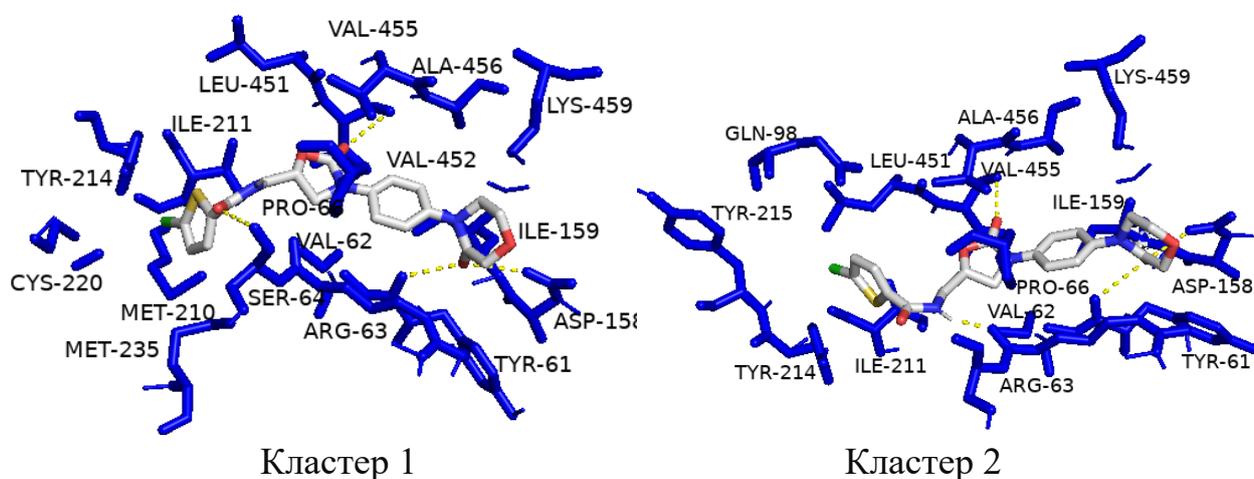


Рисунок 1 – Комплексы Ривароксабана с протеином 4RCH (PyMOL)

Для обоих кластеров характерно взаимодействие хлортиофенового фрагмента Ривароксабана с Tyr-214, который вносит существенный вклад в процесс связывания протеина с активаторами гексокиназы IV различных классов, в частности, содержащих фрагменты пиридина [6], имидазола [7], пиримидина [8].

Важное значение играет взаимодействие с Arg-63, которое также было характерно для других активаторов глюкокиназы. При этом, для энтропийно

мажорного кластера 2 (включает большее число прогонов в эксперименте по молекулярному докингу в Autodock4) взаимодействие с Arg-63 становится наиболее значимым за счет образования дополнительной водородной связи. Такие взаимодействия могут существенно менять топологию всего фермента и обеспечивать активацию гексокиназы IV за счет блокирования каталитически неактивной супероткрытой конформации. Для обоих кластеров были отмечены взаимодействия Ривароксабана с гидрофобными остатками аминокислот (Phe, Val, Met и др.), что соответствует данным работы [4].

Результаты исследования характера взаимодействия Ривароксабана с аллостерическим центром глюкокиназы показывают, что топология комплексов в пределах изученных кластеров соответствует близким суперпозициям, которые легко могут взаимопревращаться за счет конформационных переходов лиганда. Близость строения комплексов Ривароксабана с аминокислотными остатками аллостерического центра гексокиназы IV и аналогичных комплексов для лигандов соединений, которые показали биологическую активность на 1-3 стадиях клинических испытаний [6-8], позволила нам рассматривать Ривароксабан как перспективный кандидат на валидизацию гипогликемической активности в моделях *in vivo* и в клинических испытаниях.

В исследовании *in vivo* была использована аллоксановая модель сахарного диабета у крыс, характер симптоматики которого имеет сходные черты с патологией человека и широко используется в исследованиях по поиску новых гипогликемических ЛС.

Введение аллоксана привело к увеличению уровня глюкозы у экспериментальных животных на 3-и сутки.

Таблица 1 – Уровень глюкозы в крови экспериментальных животных

Группа животных	Уровень глюкозы, ммоль/л, Mean ± sd
1 – чистый контроль	7,38 ± 0,52
2 – контроль введения ривароксабана	7,26 ± 0,46
3 – сахарный диабет	11,23 ± 2,53 ¹⁾
4 – сахарный диабет + ривароксабан	7,42 ± 0,66 ²⁾

Примечание: ¹⁾ – различия достоверны по сравнению с группой 1 ($p < 0,05$)

²⁾ – различия достоверны по сравнению с группой 3 ($p < 0,05$)

Гликемический профиль экспериментальных крыс в группах контроля 1 и 2 ожидаемо соответствовал показателям здоровых животных (таблица 1). При этом в экспериментальной группе (крысы с индуцированным сахарным

диабетом) был зафиксирован статистически значимый рост концентрации глюкозы в крови; три особи были досрочно выведены из эксперимента в результате гибели на фоне экстремальных значений уровня глюкозы. У остальных экспериментальных животных группы 3 повышенный уровень глюкозы наблюдался на протяжении всего эксперимента; динамика изменения носила скачкообразный характер, что соответствует литературным данным об аллоксановом диабете у крыс [9,10].

Показатели уровня глюкозы крови крыс экспериментальной группы 4 и группы чистого контроля 1 не имели статистически значимых различий. Это свидетельствует о влиянии Ривароксабана на процессы, лежащие в основе метаболизма глюкозы при патологии. Отсутствие статистически значимых различий между показателями уровня глюкозы крови крыс групп контроля 1 и 2 косвенно подтверждает наше предположение о селективном связывании Ривароксабана с именно гексокиназой IV.

Заключение. Результаты молекулярного моделирования показали высокую аффинность Ривароксабана к аллостерическому центру гексокиназы IV. Данные эксперимента *in silico* были валидизированы в эксперименте *in vivo*, который продемонстрировал статистически значимое снижение показателей концентрации глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом, которым вводился Ривароксабан. Полученные результаты являются основанием для планирования клинических испытаний влияния Ривароксабана на метаболизм глюкозы, с целью разработки более рациональных протоколов лечения пациентов с сочетанной сердечно-сосудистой и эндокринной патологией.

Список литературы

1. Grossbard, L. Multiple hexokinases of rat tissues: purification and comparison of soluble forms. / L. Grossbard, R.T. Schimke // J. Biol. Chem. – 1966. – V. 241. – P. 3546–60.
2. Matschinsky F.M. The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. / F.M. Matschinsky, et al. // Diabetes. – 2006 - V. 55, N 1. – P. 1–12
3. Agius L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. / L. Agius // Biochem. J. - 2008. – V. 414. – P. 1–18.
4. Gloyn, A.L. Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. / A.L. Gloyn // Hum. Mutat. 2003. – V. 22, N 5. – P. 353-62. doi: 10.1002/humu.10277.
5. Ronald J. Hinklin. Discovery of 2-Pyridylureas as Glucokinase Activators. Journal of Medicinal Chemistry / Ronald J. Hinklin, et al // Journal of Medicinal Chemistry. – 2014. – Vol. 57(19), P. 8180-8186

6. Kahn, S. E. Importance of early-phase insulin secretion to intravenous glucose tolerance in subjects with type 2 diabetes mellitus. / S. E. Kahn, et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001. – V. **86**. – P. 5824–5829.

7. Yixin Ren. Glucokinase as an emerging anti-diabetes target and recent progress in the development of its agonists. / Yixin Ren, Li Li, Li Wan, Yan Huang, Shuang Cao // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* - 2022 V. 37, N 1. - P. 606-615, DOI: 10.1080/14756366.2021.2025362

8. Kamata K. Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase. // K. Kamata, M. Mitsuya, T. Nishimura, J. Eiki / *Structure*. 2004. – Vol. 12, N 3. – P. 429-38.

9. Osasenaga Macdonald Ighodaro. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies // Osasenaga Macdonald Ighodaro, et al. / *Medicina*, V 53, N6. – 2017. - P 365-374).

10. Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. / S. Lenzen, // *Diabetologia*. – 2008. – V. 51. P. 216–226. doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7.