

**ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ТИЕНОПИРИМИДИНОВ НА РАЗВИТИЕ
МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ И РАЗВИТИЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА НА
ФОНЕ ХОЛЕСТЕРИНОВОЙ ДИЕТЫ**

**Овсяникова Ю.А., Сытник К.М., Шемчук Л.А.,
Загайко А.Л.*, Филимоненко В.П.*,**

*Национальный фармацевтический университет, кафедра органической химии,
*кафедра биологической химии
г. Харьков, Украина*

Ключевые слова: тиенопиримидин, инсулинорезистентность, атеросклероз, метаболические нарушения.

Резюме: исследованы антидиабетические свойства производных тиенопиримидинов. Установлено, что наиболее выраженную активность проявил 3-амино-2-этил-7-(2-метокси-фенил)-3H-тиено[2,3-d]пиримидин-4-он, а также данное соединение тормозило прогрессирование атеросклероза.

Resume: anti-diabetic properties of derivatives of thienopyrimidine were investigated. It was found that the most pronounced activity was shown by 3-amino-2-ethyl-7-(2-methoxy-phenyl)-3H-thieno[2,3-d]pyrimidine-4-on, and this compound also inhibited progress of atherosclerosis.

Актуальность. Статистика свидетельствует о том, что 80% людей с сахарным диабетом умирают от его осложнений, в частности - заболеваний сердечно-сосудистой системы: инсульта, инфаркта миокарда, атеросклероза. Сахарный диабет является глобальной медико-социальной проблемой и занимает третье место по смертности. Поскольку на фоне роста уровня заболеваемости сахарным диабетом повышается Рис.к инвалидизации и смертность, поиск и разработка новых средств коррекции сахарного диабета является актуальным.

Цель: исследовать влияние новых синтетических соединений на развитие метаболических нарушений на модели инсулинорезистентности и развитие атеросклероза при гиперхолестериновой диете у крыс.

Задачи: 1. Изучить влияние новых синтетических соединений на развитие метаболических нарушений при экспериментальной инсулинорезистентности, вызванной высокофруктозной диетой; 2. Изучить влияние вещества-лидера, обладающего выраженными антидиабетическими свойствами, на развитие атеросклероза при гиперхолестериновой диете.

Материал и методы. Эксперимент проводили на самцах крыс линии Wistar массой 160-200 г.

Исследование инсулинорезистентности моделировали содержанием животных на диете с завышенным содержанием фруктозы (60,3 % фруктозы, 18,3 % белка, 5,2 % жиров), которая сопровождается ожирением, нарушением углеводного и липидного обменов [7].

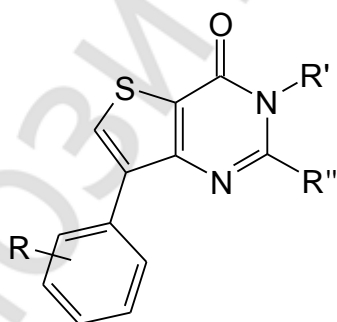
На втором этапе экспериментальный атеросклероз моделировали по классической методике М.М. Аничкова [3].

Изучалась сыворотка крови декапитированных животных.

Содержание глюкозы и инсулина определяли с использованием стандартных наборов фирмы «Филисит-Диагностика» (Украина). Уровень триацилглицеролов (ТАГ) и свободных жирных кислот (СЖК) определяли при помощи стандартных наборов фирмы «Lachema» (Чехия). Концентрацию холестерина (ХС) определяли при помощи стандартных ферментативных холестеролоксидазных наборов фирмы Boehringer Mannheim GmbH Diagnostica (Германия). Содержание ТБК-реактивных продуктов (ТБК-РАП) определяли спектрофотометрически при помощи реакции с тиобарбитуровой кислотой [5]. Состояние антиоксидантной системы оценивали путем определения концентрации восстановленного глутатиона (GSH) [4]. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы STATISTICA (StatSoft Inc., США, версия 6.0). Значимость межгрупповых особенностей оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение. Ранее были получены ряд производных 3Н-тиено[2,3-d]пиримидин-4-онов [2]. Проведенный компьютерный прогноз биологической активности показал, что соединения указанного ряда проявляют транквилизирующий, противосудорожный и антидиабетический эффекты (схема 1).

Схема 1



1. R=Cl; R'=NH₂; R''=C₂H₅
2. R=H; R'=NH₂; R''=C₂H₅
3. R=OMe; R'=NH₂; R''=C₂H₅
4. R=H; R'=NHOH; R''=H
5. R=H; R'=NH₂; R''=H
6. R=H; R'=N-пиррил; R''=H

Приведенные в таблице 1 данные наглядно демонстрируют, что содержание крыс на диете богатой фруктозой вызывает более чем трехкратное увеличение уровня глюкозы в сыворотке крови. Механизмом развития гипергликемии в условиях высокофруктозной диеты считается снижение активности глюкокиназы и активация глюкозо-6-фосфатазы в печени, то есть снижение поглощения глюкозы и увеличение ее высвобождения. Кроме того, известно, что ожирение, вызванное в том числе избытком фруктозы, сопровождается нарушением ранних этапов передачи инсулинового сигнала [8], то есть развитием нечувствительности клеток к инсулину, что ухудшает гипергликемию. В то же время наблюдается повышение уровня инсулина (Таблица 1), что, очевидно, является компенсаторной реакцией на накопление глюкозы. В отличие от глюкозы фруктоза не требует инсулин для поглощения клетками и поэтому в избытке становится субстратом для липогенеза,

что приводит к усилению синтеза ТАГ и увеличению уровня липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) в крови [7]. Это подтверждается установленным нами повышением концентрации ТАГ (Таблица1), что является следствием не только усиления образования ТАГ печенью, а и мобилизации жира из жировой ткани. В условиях избыточной массы тела при отсутствии эффектов инсулина активируется липолиз, значительно возрастает содержание продуктов гидролиза жиров – СЖК (Таблица1), которые интенсивно поступают в мышцы, печень и т.д., нарушая поглощение глюкозы и внутриклеточный обмен глюкозы, усугубляя гипергликемию и инсулинорезистентность [1].

Избыток СЖК в печени используется для синтеза ТАГ и холестерина, что также наблюдается в поставленном эксперименте (Таблица1).

Таблица 1. Содержание глюкозы, инсулина, ТАГ, СЖК и ХС в сыворотке крови крыс при высокофруктозной диете (ВФД) и введении исследуемых веществ ($M \pm m$, $n = 6$)

	Глюкоза, ммоль/л	Инсулин, пмоль/л	ТАГ, ммоль/л	СЖК, ммоль/л	ХС, ммоль/л
Интакт	4,8±0,1	103,7±13,4	1,24±0,06	0,40±0,05	2,14±0,27
ВФД	15,2±0,3*	269,6±26,4*	2,99±0,09*	0,68±0,04*	3,36±0,21*
ВФД+соединение 1	12,5±0,2*	295,3±18,2*	3,02±0,12*	0,73±0,08*	3,29±0,19*
ВФД+ соединение 2	13,8±0,1*	283,5±22,1*	3,15±0,08*	0,67±0,06*	3,31±0,16*
ВФД+ соединение 3	7,9±0,5*#	218,6±26,3*#	2,38±0,14*#	0,59±0,09*#	2,93±0,24*#
ВФД+ соединение 4	11,9±0,7*	274,8±12,8*	2,89±0,09*	0,71±0,07*	3,41±0,22*
ВФД+ соединение 5	14,5±0,4*	283,7±17,5*	3,06±0,11*	0,68±0,06*	3,39±0,18*
ВФД+ соединение 6	13,4±0,6*	267,9±21,3*	2,95±0,13*	0,66±0,05*	3,43±0,31*

* - отклонение достоверно относительно интакта ($p \leq 0,05$),

- отклонение достоверно относительно «ВФД» ($p \leq 0,05$)

Гипергликемия и гиперлипидемия неизбежно сопровождаются активацией свободнорадикальных процессов, о чем свидетельствует повышение концентрации ТБК-РАП (Таблица2). Одновременно с усилением свободнорадикального окисления наблюдается ослабление антиоксидантной защиты – снижается содержание главного водорастворимого антиоксиданта GSH (Таблица2).

Таблица 2. Содержание ТБК-АП и GSH в сыворотке крови крыс при высокофруктозной диете (ВФД) и введении исследуемых соединений ($M \pm m$, $n = 6$)

	ТБК-АП, ммоль/г	GSH, ммоль/г
Интакт	1,47±0,18	0,56±0,01
ВФД	2,65±0,41*	0,34±0,03*
ВФД+соединение 1	2,58±0,37*	0,37±0,05*
ВФД+соединение 2	2,49±0,56*	0,38±0,06*
ВФД+соединение 3	2,15±0,28*#	0,42±0,05*#
ВФД+соединение 4	2,89±0,51*	0,33±0,07*
ВФД+соединение 5	2,86±0,63*	0,36±0,03*
ВФД+соединение 6	2,53±0,43*	0,34±0,02*

* - отклонение достоверно относительно интакта ($p \leq 0,05$),

- отклонение достоверно относительно «ВФД» ($p \leq 0,05$)

Приведенные данные (Таблица1) свидетельствуют о том, что введение пяти из шести исследуемых соединений (1, 2, 4, 5, 6) существенно не влияет ни на уровень глюкозы и инсулина, ни на параметры липидного обмена. Только лишь при введении соединения 3 отмечается снижение накопления всех исследуемых показателей: уровень глюкозы уменьшился на 48% от контрольной патологии, уровень инсулина – на 20%, содержание липидов – на 13-20% (Таблица1). Подобная тенденция установлена и относительно влияния на показатели прооксидантно-антиоксидантного статуса – введение соединения 3 достоверно снижает накопление ТБК-АП (на 19%) и повышает уровень GSH (на 23%) при высокофруктозной диете (Таблица2).

Вышесказанное позволяет сделать вывод, что соединение 3 проявляет антидиабетические свойства.

Полученные данные (Таблица1-2) показывают, что экспериментальная инсулинорезистентность сопровождается повышением атерогенных липидов (ТАГ и ХС) и, соответственно, ЛПОНП. Избыток глюкозы при этом обуславливает гликозирование этих липопротеинов, а активные метаболиты кислорода в условиях снижения антиоксидантов усиливают кислородное повреждение ЛПОНП. Все это способствует более интенсивному захвату данных липопротеинов макрофагами сосудов, то есть сопровождается атерогенным повреждением сосудов.

Так как соединение 3 обладает нормализующим влиянием на все изученные показатели в условиях инсулинорезистентности, задачей следующего этапа было исследование влияние данного соединения на содержание липидов в стенке аорты крыс, которых содержали на гиперхолестериновой диете.

Согласно полученным данным (Таблица3), через 30 суток холестериновая нагрузка приводит к накоплению общих липидов, содержание которых увеличивается на 22% по сравнению с интактом. Уровень общего холестерина увеличивается на 24%, а эфиров холестерина – на 33%.

Таблица 3. Содержание общих липидов (ОЛ), холестерина и эфиров холестерина (ЭХС) в стенке аорты крыс при холестериновой диете (ХСД) и введении соединения 3 ($M \pm m$, $n = 6$)

	ОЛ, мг/г сырой ткани	ХС, мг/г сырой ткани	ЭХС, мг/г сырой ткани
Интакт	50,3±1,47	2,43±0,09	6,74±0,38
ХСД	61,5±2,01*	3,01±0,12*	8,95±0,25*
ХСД+соединение 3	56,1±1,58*#	2,78±0,06*#	7,81±0,18*#

* - отклонение достоверно относительно интакта ($p \leq 0,05$),

- отклонение относительно «ХСД» ($p \leq 0,05$)

Введение соединения 3 уменьшает накопление липидов, вызванное холестериновой диетой – содержание общих липидов снижается на 10%, общего холестерина – на 8%, эфиров холестерина – на 13% (Таблица3).

Таким образом, экспериментальный атеросклероз сопровождается накоплением липидов в стенке аорты, а применение соединения 3 тормозит прогрессирование атеросклероза, уменьшая накопление липидов.

Выводы: 1. Синтетические соединения 1, 2, 4, 5, 6 не оказывают влияние на развитие метаболических нарушений, обусловленных высокофруктозной диетой; 2. Синтетическое соединение 3 уменьшает изменения всех исследуемых показателей при инсулинорезистентности, а также оказывает нормализующее влияние на содержание липидов при экспериментальном атеросклерозе; 3. Антидиабетические и антиатерогенные свойства соединения 3 могут быть использованы при разработке новых средств коррекции инсулинорезистентности и атерогенных состояний.

Литература

1. Загайко А. Л. Метаболічний синдром: механізми розвитку та перспективи антиоксидантної терапії: Монографія / А. Л. Загайко, Л. М. Вороніна, К. В. Стрельченко. – Х.: Вид-во НфаУ: Золоті сторінки, 2007. – с. 216.
2. Овсяникова Ю.А., К.М. Сытник, В.П. Черных, Шемчук Л.А. Простой метод синтеза 3-амино-2-*R*-7-(*R'*-фенил)-3*H*-тиено[2,3-*d*]пиримидин-4-онов // Фармация Казахстана – 2015. - № 5. – С. 39-45.
3. Піскун Р. П., Гринчак Н. М. Особливості мікрморфометричних змін структур серця при експериментальному атеросклерозі та його генній корекції / Р. П. Піскун, Н. М. Гринчак // Вісник проблем біології – 2011 – Вип. 3, Т. 2, № 88. – с. 147-150
4. Путилина Ф. Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях / Ф. Е. Путилина / Методы биохимических исследований. Под ред. Прохоровой М. И. – Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. – с. 183–185.
5. Строев Е. А. Практикум по биологической химии / Е. А. Строев, В. Г. Макарова – М.: Высшая школа, 1986. – с. 231.
6. Glucocorticoids and tumor necrosis factor increase oxidative stress and suppress wnt protein signaling in osteoblasts / M. Almeida, L. Han, E. Ambrogini [et al.] // The J Biol Chem – 2011. – V. 286, № 52. – P. 44326–44335.
7. Endothelial dysfunction in high fructose containing diet fed rats: increased nitric oxide and decreased endothelin-1 levels in liver tissue / M. Altas, A. Var, K. Ozbilgin [et al.] // Dicle University Med School – 2010. – V. 37, № 3. – P. 193-198.
8. A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats / R. M. Bezerra, M. Ueno, M. S. Silva [et al.] // J Nutr — 2000. — Vol. 130, № 10. — P. 1531– 1535.