

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-5-17-20

ВЛИЯНИЕ 4,4'-(ПРОПАНДИАМИДО)ДИБЕНЗОАТА НАТРИЯ И МЕТФОРМИНА НА ДИНАМИКУ АПОПТОЗА И ПРОЛИФЕРАЦИИ ГЕПАТОЦИТОВ У МЫШЕЙ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ И ОЖИРЕНИЕМ

Е. Д. Бажанова^{1,2,3}, С. В. Оковитый⁴, М. А. Белых⁴

Изучено влияние 4,4'-(пропандиамидо)добензоата натрия (малобен) и метформина на динамику апоптоза и пролиферации гепатоцитов у линейных мышей balb/c и db/db. Установлено, что развитие ожирения и сахарного диабета у мышей линии db/db сопровождается повышением уровня апоптоза в гепатоцитах при уменьшении их пролиферативной активности. Ежедневное внутривенное применение в течение 30 дней метформина (300 мг/кг) или малобена (10 мг/кг) у мышей обеих линий уменьшает выраженность апоптотических изменений в гепатоцитах в среднем на 79,18 и 61,54 %, $p < 0,05$ (группа мышей balb/c и db/db, получавших метформин, соответственно), и 52,79 и 63,3 %, $p < 0,05$ (группа мышей balb/c и db/db, получавших малобен, соответственно). Отмечено стимулирующее влияние малобена на пролиферативную активность гепатоцитов у мышей линии db/db в среднем на 9,68 %, $p < 0,05$.

Ключевые слова: апоптоз гепатоцитов; пролиферация гепатоцитов; неалкогольная жировая болезнь печени; мыши.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наблюдается увеличение распространенности заболеваний, которые сопровождаются развитием инсулинорезистентности (метаболический синдром, сахарный диабет 2 типа, ожирение, дислипидемия). Это сопровождается пропорциональным ростом специфических поражений печени в виде жировой болезни печени. По данным последних исследований распространенность такой патологии в развитых странах в виде стеатоза может составлять в популяции свыше 25 % (в некоторых регионах и более 50 %), а неалкогольного стеатогепатита — до 5 % [10]. По данным Российского исследования DIREG 2 у 37,3 % пациентов, обратившихся за помощью к терапевту, обнаружена неалкогольная жировая болезнь печени. У этих больных повышен риск возникновения изменений сердца и сосудов, что подтверждается многочисленными исследованиями в этой области [2].

При жировом гепатозе регенеративная способность печени снижается и изменение баланса между пролиферацией и гибелью печеночных клеток приводит к разви-

тию таких тяжелых осложнений, как цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома [8]. Апоптоз гепатоцитов при неалкогольной жировой болезни печени (НЖБП) является одним из определяющих факторов развития прогрессирующих форм заболевания [15].

Идентификация особенностей апоптоза и его интенсивности в гепатоцитах при заболеваниях печени важна и может способствовать разработке новых подходов к лекарственной терапии и применению в клинической практике неинвазивных биомаркеров неалкогольной жировой болезни печени.

Эффективная фармакотерапия жирового гепатоза до настоящего времени не разработана, однако круг фармакологических препаратов, способных оказывать определенное влияние на этот процесс, известен. Тем не менее, учитывая их недостаточную эффективность, имеется высокая потребность в появлении новых эффективных лекарственных средств, которые позволили бы расширить имеющийся арсенал препаратов для лечения стеатоза печени. Поэтому целью нашего исследования явилось изучение влияния 4,4'-(пропандиамидо)добензоата натрия (малобен) и метформина на динамику апоптоза и пролиферации гепатоцитов у линейных мышей balb/c и db/db.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на 30 мышках-самцах линии C57BL/KsJYLepr^{db/+} (db/db) массой 30–35 г, в качестве контроля использовали 30 мышей линии balb/c массой 20–22 г (ФГБУН “Научный центр биомедицинских технологий ФМБА”, филиал “Андреевка”, Московская обл.). Мыши линии db/db несут рецессивный ген leptin receptor-Leprdb-(db) (8-я группа сцепления, 4-я хромосо-

¹ ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук, Россия, 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44.

² ФГБОУ ВО Астраханский государственный университет, Россия, 414040, Астрахань, ул. Татищева, 20а.

³ ФГБУН Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства РФ, Россия, 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1.

⁴ ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Минздрава РФ, Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова 14/А.

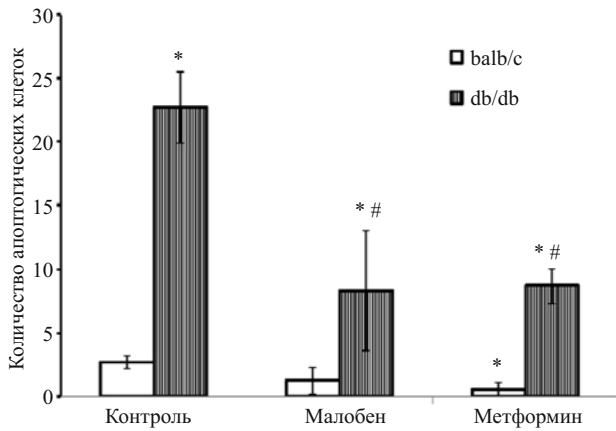


Рис. 1. Уровень апоптоза гепатоцитов мышей линий balb/c и db/db после введения малобена и метформина (TUNEL). По оси ординат — количество апоптотических клеток, абсолютные значения;

* достоверность различий ($p < 0,05$), по сравнению с контрольными животными той же линии;

достоверность различий ($p < 0,05$), по сравнению с аналогичной группой мышей balb/c.

ма). Они представляют собой удобный объект для изучения ожирения, сахарного диабета, дислипидемии и стеатоза печени [3, 4].

Животных содержали по 10 особей в клетке в стандартных условиях вивария при температуре воздуха 18–22 °С и относительной влажности воздуха 50–65 %. В ходе эксперимента обеспечивался свободный доступ к воде; корм для животных выдавали из расчета 5 г/сут на 30 г массы животного.

Все эксперименты выполняли в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 “Принципы надлежащей лабораторной практики”, Приказом Минздрава РФ от 01.04.16 г. № 199н “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики”.

Животные были разделены на 6 групп по 10 животных в каждой: 2 контрольные группы — мыши линий balb/c и db/db, получавшие воду очищенную; 2 группы животных линий balb/c и db/db, получавших в течение 1 мес (30 сут) метформин (Sigma, США) в дозе 300 мг/кг/сут; 2 группы мышей линий balb/c и db/db, получавших в течение 28 сут 4,4’-(пропандиамидо)добензоат натрия (малобен) в дозе 10 мг/кг/сут. Малобен был синтезирован на кафедре органической химии ФГБОУ ВО СПХФА Минздрава России. Чистота субстанции составила 99,5 %. Исследуемые вещества вводили с помощью зонда внутривенно в виде водных растворов объемом 0,3 мл, контрольные группы получали эквивалентное количество воды очищенной. Выбор дозы основывали на литературных данных [1, 13].

После выведения животных из эксперимента быстрой декапитацией на 31 сут эксперимента печень извлекали и фиксировали в 4 % формалине, после чего образцы органа замораживали при температуре –25 °С для получения криостатных срезов (6 мкм) (Криостат Leica CM1900, Германия, Leica).

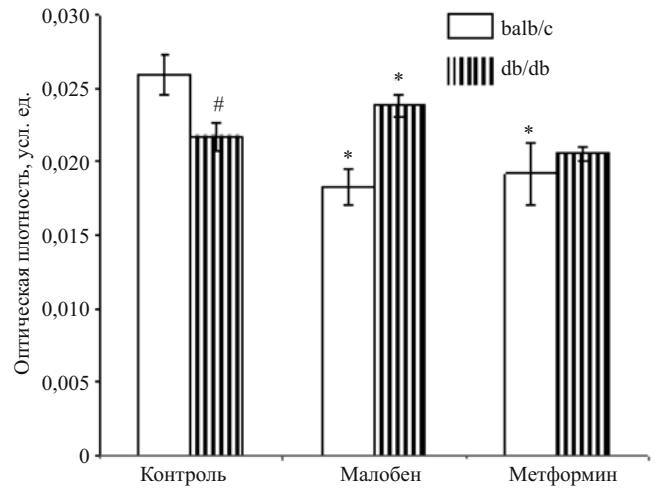


Рис. 2. Уровень экспрессии Ki67 в гепатоцитах мышей линий balb/c и db/db после введения малобена и метформина (ИГХ).

* Достоверность различий ($p < 0,05$), по сравнению с контрольными животными той же линии;

достоверность различий ($p < 0,05$), по сравнению с аналогичной группой balb/c.

Для оценки уровня апоптоза в ткани печени использовали метод TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) (нерадиоактивное мечение биотином, выявление диаминобензидином) с использованием терминальной дезоксирибонуклеотидил-трансферазы для выявления разрывов ДНК (TUNEL Sileks, Россия). Иммуногистохимическое (ИГХ) определение экспрессии белков на срезах печени проводили с использованием немеченных поликлональных антител к маркеру пролиферации Ki67 (Abcam) [14].

Изображения срезов печени после выполнения ИГХ реакций и TUNEL были получены с помощью микроскопа PFM (WPI, USA) и цветных видеокамер DIC-E (WPI, USA) и Leica DFC 300 FX (Германия) с разрешением 1392 × 1040 пикселей (увеличение × 40). Для оценки интенсивности экспрессии изучаемого белка и уровня апоптоза использовали программу VideoTest Software.

Количество апоптотических клеток (TUNEL-позитивных гепатоцитов, абсолютные значения, т.е. подсчитывалось количество темноокрашенных апоптотических клеток, взятое как среднее на один срез) подсчитывали на 4–5 срезах печени у каждой мыши с последующим определением среднего количества TUNEL-позитивных гепатоцитов на группу.

Оптическую плотность иммунореактивного вещества в Ki67-иммунореактивных (ИР) клетках определяли на 5–6 срезах печени для каждого животного. На основании этого высчитывали среднюю оптическую плотность (выражена в относительных единицах, представляющих отношение яркости фона к яркости объекта) изучаемого белка для группы мышей.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ “Statistica 6.0”. Значимость различий при нормальном распределении количественных признаков оценивали с помощью t-критерия Стьюдента (для независимых выборок). Статистическую

значимость изменений показателей в динамике у животных одной и той же группы оценивали, применяя критерий Вилкоксона для связанных выборок. Числовые данные представлены в виде: среднее арифметическое (M) \pm стандартное отклонение (SD). Уровень достоверной вероятности был задан равным 95 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенным исследованием установлено, что у мышей линии balb/c в контрольной группе уровень апоптоза гепатоцитов является невысоким, составляя 2,7 %. У мышей db/db количество гибнущих клеток в контроле было значительно выше (в 8,4 раза, $p < 0,05$) (рис. 1).

После введения малобена уровень апоптоза гепатоцитов у мышей линии balb/c достоверно не изменялся, а при введении метформина снижался в 4,8 раза, по сравнению с контрольными животными этой линии ($p < 0,05$).

Использование изученных препаратов у db/db мышей позволило значительно уменьшить количество гибнущих гепатоцитов (на фоне малобена — в 2,7 раза, метформина — 2,6 раза) по сравнению с контрольной db/db группой, не приводя, однако, этот показатель до уровня такового у мышей дикого типа.

Иммуногистохимическое определение в гепатоцитах маркера пролиферации Ki67 показало, что количество Ki67-иммунореактивных гепатоцитов в контрольной группе мышей db/db было достоверно ниже, чем у мышей линии balb/c (рис. 2).

Введение как малобена, так и метформина мышам линии balb/c вызывало снижение уровня пролиферации гепатоцитов. Однако у мышей линии db/db применение малобена приводило к достоверному повышению уровня пролиферации, в отличие от метформина, который не вызывал каких-либо изменений.

Поражение печени при сахарном диабете и ожирении имеет множество общих черт и проявляется развитием жирового поражения органа, в том числе у мышей линии db/db. Как установлено в настоящем эксперименте с использованием в качестве маркера пролиферативной активности белка Ki67, ядерного белкового комплекса с молекулярной массой 345 – 395 кДа, при этом снижается пролиферативная активность гепатоцитов в печени db/db мышей. Это может быть обусловлено снижением уровня MiR-19a, члена семейства miR-17-92-кластеров, промотирующих клеточную пролиферацию и ангиогенез через регуляцию PI3-K/AKT-пути, основного инсулин-сигнального пути [7]. Также у мышей этой линии повышен апоптоз гепатоцитов [11], снижена пролиферация и повышен уровень апоптоза интерстициальных клеток почек [19], а также клеток молочной железы при раке [16]. По данным других авторов, обнаружено повышение уровня пролиферации при одновременной супрессии апоптоза в мезангиальных клетках db/db мышей [9].

Метформин является гипогликемическим препаратом, широко применяющимся в клинической практике при сахарном диабете 2 типа, сопровождающемся ожирением, а также у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени. Однако существует мало данных о влиянии пре-

парата на апоптоз клеток, в частности, гепатоцитов в условиях патологии, и на их пролиферативную активность.

Данные литературы о влиянии метформина на пролиферативную активность и уровень апоптоза противоречивы. Так, показано, что метформин ингибирует пролиферацию и индуцирует апоптоз посредством активации AMP-киназы в клеточных линиях гепатоцеллюлярной карциномы [12], причем показана активация митохондриального апоптотического каскада [17]. Механизм активации апоптоза рассмотрен достаточно подробно показана дозозависимая остановка клеточного цикла в фазе G0/G1 через AMP-протеинкиназу и LKB1-киназу, урегулирующую p21/Cip1 и p27/Kip1 и down-регуляцию циклина D, независимо от активации онкосупрессора p53 [6].

Показано позитивное влияние метформина на клеточную пролиферацию и дифференцировку нейробластов в зубчатой извилине у мышей, находящихся на высокожировой диете. Введение этого препарата предупреждает снижение количества Ki67-иммунореактивных ядер в нейробластах в данной области, таким образом обеспечивает высокую пролиферативную активность [18]. В то же время есть данные, что метформин не влияет на клеточную пролиферацию (исследование Ki67-иммунореактивности) и апоптоз (каспаза-3) клеток рака пищевода у людей [5].

В немногочисленных исследованиях на db/db мышках при введении метформина показано повышение уровня апоптоза медуллярных интерстициальных клеток почки так же, как и у мышей дикого типа [19]. Другими авторами выявлено угнетение программированной клеточной гибели мезангиальных клеток, индуцированной липотоксичностью, посредством активации метформином рецептора 1 глюкагон-подобного пептида (GLP-1R) [9]. В данном эксперименте введение метформина приводило к уменьшению апоптоза гепатоцитов как у мышей balb/c, так и у мышей db/db. У db/db мышей снижение этого процесса в гепатоцитах имеет положительное значение, поскольку у таких животных в контроле уровень клеточной гибели резко повышен. Не выявлено влияния данного препарата на количество Ki67-иммунореактивных гепатоцитов у db/db мышей, тогда как у мышей линии balb/c метформин подавлял пролиферацию гепатоцитов.

При многих заболеваниях, в том числе ожирении, сахарном диабете и неалкогольной жировой болезни печени, одним из механизмов развития патологии является повышение процессов липопероксидации в клетках, что приводит к развитию митохондриальной дисфункции, нарушению функционирования мембран и, может способствовать инициации апоптоза [19]. Малобен первоначально изучался в качестве гиполлипидемического средства с антиоксидантной и кардиопротекторной активностью [1]. В проведенном исследовании малобен приводил к снижению начально ускоренного уровня апоптоза гепатоцитов у мышей линии db/db. Кроме того, это соединение повышало уровень пролиферации гепатоцитов (содержание Ki67-иммунореактивного материала), сниженный у мышей db/db линии.

Таким образом, впервые изучено действие 4,4'-(пропандиамидо)добензоат натрия (малобена) на гепатоциты мышей линии db/db, страдающих ожирением, сахарным

диабетом, дислипидемией и стеатозом печени. Выявлены позитивные эффекты малобена, проявляющиеся уменьшением клеточной гибели гепатоцитов у мышей линии db/db и нормализацией их пролиферации.

ВЫВОДЫ

1. У мышей линии db/db с сахарным диабетом и ожирением выявлено повышение уровня апоптоза в гепатоцитах в 7,44 раза ($p < 0,05$) при уменьшении их пролиферативной активности на 16,2 % ($p < 0,05$), по сравнению с гепатоцитами у мышей линии balb/c.

2. Метформин в дозе 300 мг/кг и 4'-(пропандиамидо)добензоат натрия в дозе 10 мг/кг при внутрижелудочном введении в течение 28 дней оказывают однонаправленное действие, достоверно уменьшают выраженность апоптоза в гепатоцитах на 79,2 % ($p < 0,05$) и 52,8 % ($p < 0,05$), соответственно, у мышей balb/c и на 61,5 % ($p < 0,05$) и 63,3 % ($p < 0,05$) у db/db мышей.

3. 4'-(Пропандиамидо)добензоат натрия в дозе 10 мг/кг при внутрижелудочном введении в течение 28 дней оказывает стимулирующее действие на пролиферативную активность гепатоцитов у мышей линии db/db, повышая в них уровень экспрессии Ki67 на 6,7 % ($p < 0,05$) по сравнению с исходным уровнем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Г. Громова, Ю. Н. Зубжицкий, И. Л. Парнова, *Фармакол. и токсикол.*, **46**(2), 66 – 68 (1983).
2. В. Т. Ивашкин, О. М. Драпкина, И. В. Маев и др., *Рос. ж. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.*, **25**(6), 31 – 38 (2015).
3. О. И. Степанова, Н. Н. Каркищенко, О. В. Баранова и др., *Биомедицина*, **1**(2), 28 – 40 (2009).
4. Q. M. Anstee, R. D. Goldin., *Int. J. Exp. Pathol.*, **87**(1), 1 – 16 (2006).
5. A. Chak, N. S. Buttar, N. R. Foster, et al., *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **13**(4), 665 – 672 (2015).
6. H. P. Chen, J. J. Shieh, C. C. Chang, et al., *Gut.*, **62**(4), 606 – 615 (2013).
7. L. Dou, X. Meng, X. Sui, et al., *Sci. Rep.*, **5**, 11602 (2015).
8. Y. Inaba, T. Furutani, K. Kimura, et al., *Hepatology*, **61**(4), 1343 – 1356 (2015).
9. D. I. Kim, M. J. Park, Y. R. Heo, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **584**, 90 – 97 (2015).
10. Non-alcoholic Fatty Liver Disease Study Group, *Dig Liver Dis.*, **47**(12), 997 – 1006 (2015).
11. E. C. Park, S. I. Kim, Y. Hong, et al., *Gastroenterology*, **147**(4), 860 – 869 (2014).
12. T. Saito, T. Chiba, K. Yuki, et al., *PLoS One*, **8**(7), e70010 (2013).
13. A. Spruss, G. Kanuri, C. Stahl, et al., *Lab. Invest.*, **92**(7), 1020 – 1032 (2012).
14. L. A. Sternberger, S. A. Joseph, *J. Histochem. Cytochem.*, **27**(11), 1424 – 1429 (1979).
15. C. Y. Wang, L. Y. Chau, *Chang Gung Med. J.*, **33**(1), 13 – 24 (2010).
16. Y. Xiao., S. Zhang., G. Hou, et al., *Tumour Biol.*, **35**(3), 2035 – 2045 (2014).
17. Y. Xiong, Q. J. Lu, J. Zhao, et al., *Asian. Pac. J. Cancer. Prev.*, **13**(7), 3275 – 3279 (2012).
18. D. Y. Yoo, W. Kim, S. M. Nam, et al., *Neurochem Res.*, **36**(12), 2401 – 2408 (2011).
19. S. Zheng, J. Liu, Q. Han, et al., *J. Diabetes.*, **6**(2), 132 – 146 (2014).

Поступила 17.01.18

EFFECT OF SODIUM 4,4'-(PROPANEDIAMIDE)DIBENZOATE AND METFORMIN ON THE DYNAMICS OF APOPTOSIS AND PROLIFERATION OF HEPATOCYTES IN MICE WITH DIABETES AND OBESITY

E. D. Bazhanova^{1,2,3}, S. V. Okovityi⁴, and M. A. Belykh⁴

¹ Laboratory of Comparative Biochemistry of Cell Functions, Federal State Budgetary Institution of Science Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Thorez prosp. 44, St. Petersburg, 194223 Russia

² Joint Laboratory for the Investigation of the Role of Apoptosis, Astrakhan State University, 414040, Astrakhan, ul. Tatischev, 20a

³ Laboratory of Morphology and Electron Microscopy, Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, 192019, ul. Bekhterev, 1

⁴ Pharmacology and Clinical Pharmacology Department, Federal State Budgetary Institution of Higher Education St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University of the Ministry of Health of Russia, ul. Prof. Popova 14/A, St. Petersburg, 197376 Russia

We have studied the effect of sodium 4,4'-(propanediamide)dibenzoate (maloben) (intra-gastric administration in a dose of 10 mg/kg/day for 30 days) and metformin (intra-gastric administration in a dose 300 mg/kg/day for 30 days) on the dynamics of apoptosis and proliferation in balb/c and db/db mice hepatocytes. It was found, that the development of obesity and diabetes in db/db mice is accompanied by an increase in apoptosis level in hepatocytes and a decrease in their proliferative activity. The everyday treatment with drugs decreases the level of apoptotic changes in hepatocytes on average by 79.18 and 61.54%, $p < 0.05$, in groups of balb/c and db/db mice, respectively, for metformin and by 52.79 and 63.3%, $p < 0.05$, in groups of balb/c and db/db mice, respectively, for maloben. A stimulating effect (on average 9.68%, $p < 0.05$) of malaben on the proliferative activity of hepatocytes was observed in mice of the db/db line.

Keywords: apoptosis of hepatocytes; proliferation of hepatocytes; non-alcoholic fatty liver disease; mice.