

ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ДИБЕНЗО[b, d] ПИРАН-6-ОНА НА МОДЕЛИ СТРЕПТОЗОТОЦИН ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА У КРЫС

Н.И. Кащенко¹, И.В. Свиридов¹, Т.Г. Горностай²

¹ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия

² Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия

Сахарный диабет (СД) – известное метаболическое заболевание, характеризующееся аномальным постпрандиальным (возникающим после еды) повышением уровня глюкозы в крови. В структуре эндокринных заболеваний СД занимает лидирующее положение. Вследствие быстрого роста заболеваемости, высокой смертности, ранней инвалидизации лиц молодого, трудоспособного возраста, снижения качества жизни, СД представляет важную не только медицинскую, но и серьезную социальную проблему [1].

Анализируя сведения последних обзорных работ по данному направлению, можно отметить, что особый интерес вызывают у исследователей соединения фенольной природы [2]. Эллаготаннины как высокомолекулярные полифенольные соединения растительного происхождения обладают широким спектром биологической активности [3,4]. Однако, согласно последним данным научной литературы, эллаготаннины обладают низкой биодоступностью, и за проявление биологических эффектов в живом организме отвечают уролитины – производные дибензо [b, d] пиран-6-она, которые продуцируются микробиотой кишечника человека из эллаготаннинов и усваиваются значительно лучше своих предшественников [5]. Данный класс соединений наименее изучен и является перспективным для поиска и создания высокоактивных антидиабетических средств. Следует отметить, что выделение уролитинов из биологических жидкостей человека – многоэтапный и затратный процесс. В свою очередь, целенаправленный химический синтез уролитинов в условиях *in vitro* достаточно легко реализуем [6]. Нами были синтезированы производные дибензопиран-6-она, структурные формулы которых приведены на рисунке 1.

8-О-метилуролитин А (3-гидрокси-8-метокси-дибензо-[b, d] пиран-6-он). 2-Бром-5-метоксибензойную кислоту (1 г), резорцин (1 г) и NaOH (0,4 г) в воде (5 мл) нагревали с обратным холодильником в течение 30 минут. После добавления водного CuSO₄ (5 %, 2 мл) смесь кипятили с обратным холодильником 10 минут, в течение которых 8-О-метилуролитин А (0,70 г.) осаждался в виде белого порошка. Осадок отфильтровывали и подвергали колоночной хроматографии на силикагеле для очистки.

Уролитин А (3,8 – дигидрокси-дибензо-[b, d] – пиран-6-он). Раствор 2-бром-5-метоксибензойной кислоты (2,5 г) и AlCl₃ (7,5 г) в хлорбензоле (75 мл) кипятили с обратным холодильником в течение 2,5 часов. После охлаждения смесь экстрагировали диэтиловым эфиром (3×125 мл). Эфирные извлечения выпаривали, получая 2-бром-5-гидроксибензойную кислоту (2 г). 2-бром-5-гидроксибензойную кислоту (1,5 г), резорцин (1,6 г) и NaOH (0,6 г) в воде (8 мл) нагревали с обратным холодильником в течение 30 минут. После добавления водного CuSO₄ (5 %, 3 мл) смесь кипятили с обратным холодильником еще 10 минут, в течение которых уролитин А (1 г) осаждался в виде белого порошка. Осадок отфильтровывали и подвергали колоночной хроматографии на силикагеле для очистки.

3,8 – диметокси-дибензо-[b, d] – пиран-6-он. K₂ CO₃ (31 г.) и диметилсульфат (26,5 г) добавляли к раствору 8-О-метилуролитина А (0,5 г) в ацетоне (300 мл). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 40 мин. Осадок отфильтровывали, растворяли в этилацетате (30 мл) и промывали водой (3×50 мл). Органическую фазу отделяли, высушивали (Na₂ SO₄), фильтровали и концентрировали в вакууме. Осадок отфильтровывали и подвергали колоночной хроматографии на силикагеле для очистки.

3-гидрокси-дибензо-[b, d] – пиран-6-он. Раствор 2-бромбензойной кислоты (2 г), резорцина (2 г) и NaOH (0,4 г) в воде (20 мл) кипятили с обратным холодильником в течение 30 мин. Затем к смеси добавляли 10 % водный раствор CuSO₄ (0,5 мл) и реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение еще 1 часа. Осадок отфильтровывали и подвергали колоночной хроматографии на силикагеле для очистки.

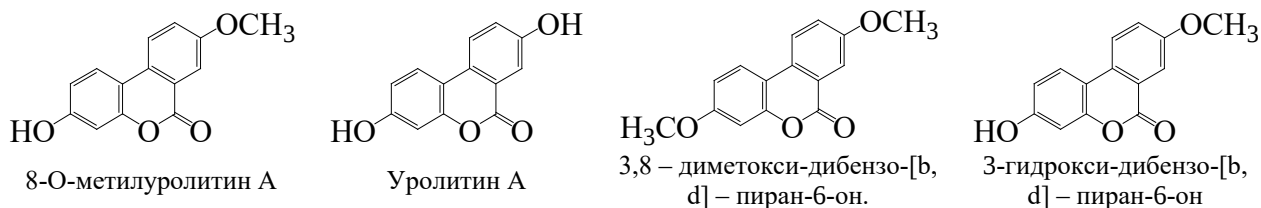


Рисунок 1. Структурные формулы синтезированных соединений

Гипогликемические свойства синтезированных производных дибензо [b, d] пиран-6-она были исследованы на модели стрептозотоцин-индуцированной гипергликемии, принцип действия которой заключался в частичном разрушении бета-клеток островков Лангерганса диабетогенным агентом стрептозотоцином (STZ), приводившему к недостаточному выделению инсулина [7]. Недостаточное высвобождение инсулина вызывало гипергликемию, что приводило к окислительному повреждению путем образования реакционноспособных видов кислорода и развития диабетических осложнений.

Крысам линии Вистар внутрибрюшинно вводили STZ, растворенный в свежеприготовленном 0,1 М цитратном буфере (pH 6,5) в дозе 60 мг/кг. Животные контрольной группы получали равный объем раствора диметилсульфоксида в воде (1:1). Через 3 дня после введения STZ определяли уровень глюкозы в крови у всех крыс. Крысы с уровнем глюкозы в крови более 250 мг/дл считались больными диабетом. Крысам с выявленным диабетом вводили инсулин, данная группа характеризовалась как положительный контроль. Уровень глюкозы в крови натошак у всех крыс определяли до начала эксперимента. Крысы были разделены на следующие группы: (1) контрольная группа, получавшая только раствор диметилсульфоксида в воде (1:1) (300 мкл/кг/раз в день, ежедневно); (2) группы крыс, инъецированные стрептозотоцином (10 мг/кг/день) и принимавшие: (3) 8-О-метилуролитин А (300 мг/кг/день); (4) уролитин А (300 мг/кг/день); (5) 3,8–диметокси-дibenзо-[b, d]–пиран-6-он (300 мг/кг/день); (6) 3-гидрокси-дibenзо-[b, d]–пиран-6-он; (7) инсулин (5 ед./кг/день); крысы без диабета, которым вводили (8) 8-О-метилуролитин А (300 мг/кг/день); (9) уролитин А (300 мг/кг/день); (10) 3,8–диметокси-дibenзо-[b, d]–пиран-6-он (300 мг/кг/день); (11) 3-гидрокси-дibenзо-[b, d]–пиран-6-он. Исследованные уролитины растворяли в растворе диметилсульфоксида и воды (1:1) и ежедневно вводили крысам через желудочный зонд, инсулин вводили подкожно. Период исследования продолжался в течение 21 дня, содержание глюкозы в крови натошак у животных определялось на 1, 7, 14 и 21 день. Плазменный инсулин определяли с помощью энзим-связанного иммуносорбентного анализа (набор ELISA для инсулина крыс / мышей). Общий гемоглобин (Hb) и гликозилированный гемоглобин A_{1c} (HbA_{1c}) определяли хроматографическим методом с использованием катионообменной смолы (комплект гемоглобина A_{1c}, BioSystem S.A.) и количественно определяли спектрофотометрическим методом при 415 нм.

По результатам экспериментальных исследований наблюдалась сильная потеря веса у животных, получавших STZ, по сравнению с контрольной группой (Таблица 1). Механизм его неясен. Это может быть связано со многими факторами, такими как потеря аппетита, увеличение мышечной потери и потери белков ткани. Значительное снижение уровня инсулина в плазме (6.04 ед./л против 16.01 ед./л в контрольной группе) и общего гемоглобина (7.31 мг/дл против 15.07 мг/дл в контрольной группе) наблюдалось в группе крыс, больных диабетом, а также наблюдалось значительное повышение уровня гликозилированного гемоглобина (HbA_{1c}; 12.48 % Hb против 5.35 % Hb в контрольной группе). Все упомянутые изменения свидетельствуют о неудовлетворительном гликемическом контроле, данные результаты соответствуют диабету 2 типа. Пероральное введение производных дибензо [b, d] пиран-6-она увеличивало массу тела у крыс с диабетом по сравнению с группой STZ. Наибольшее увеличение массы тела наблюдалось в группе крыс, получавших уролитин А, наименьший прирост – в группе крыс, принимавших 3,8 – диметокси-дibenзо-[b, d] – пиран-6-он (207 г. против 164 г.). Снижение уровня глюкозы в крови зависело от дозы и наблюдалось с седьмого дня обработки у диабетических крыс, получавших уролитин А и инсулин, достигая максимальных значений через 21 день. У STZ диабетических крыс уролитин А проявлял большую гипогликемическую активность с постепенным снижением гликемии до достижения максимума через 21 день. Применение уролитина А показало низкую активность в снижении ответа уровня глюкозы в крови натошак, достигая максимального значения через 21 день. Обработка недиабетических крыс производными дибензо [b, d] пиран-6-она не влияла на уровень глюкозы в крови натошак в течение 21 дня эксперимента.

Таблица 1. Параметры массы тела, инсулина, общего гемоглобина и гликозилированного гемоглобина контрольной и экспериментальной групп, среднее значение $\pm$ SD

Экспериментальная группа	Масса тела, г.		Инсулин, ед./л	Общий гемоглобин, мг/дл	Гликозилированный гемоглобин, %Hb
	0 день	21 день			
Контроль	201 $\pm$ 6	231 $\pm$ 5	16.01 $\pm$ 1.07	15.07 $\pm$ 0.89	5.35 $\pm$ 0.44
STZ	197 $\pm$ 7	124 $\pm$ 7	6.04 $\pm$ 1.14	7.31 $\pm$ 0.91	12.48 $\pm$ 0.32
STZ + 8-О-метилуролитин А	199 $\pm$ 5	191 $\pm$ 6	10.01 $\pm$ 1.22	9.07 $\pm$ 0.86	8.32 $\pm$ 0.25
STZ + Уролитин А	196 $\pm$ 6	207 $\pm$ 4	11.08 $\pm$ 0.99	10.88 $\pm$ 0.77	7.51 $\pm$ 0.29
STZ + 3,8-диметокси-дibenзо-[b, d]-пиран-6-он.	197 $\pm$ 7	164 $\pm$ 7	8.22 $\pm$ 1.12	8.14 $\pm$ 0.64	9.12 $\pm$ 0.30
STZ + 3-гидроксидibenзо-[b, d]-пиран-6-он	200 $\pm$ 4	187 $\pm$ 5	8.64 $\pm$ 1.03	9.31 $\pm$ 0.80	8.56 $\pm$ 0.27
STZ + Инсулин	197 $\pm$ 5	226 $\pm$ 6	15.87 $\pm$ 1.09	14.99 $\pm$ 0.79	5.33 $\pm$ 0.33
8-О-метилуролитин А	198 $\pm$ 4	225 $\pm$ 5	15.94 $\pm$ 1.01	14.94 $\pm$ 0.69	5.59 $\pm$ 0.26
Уролитин А	198 $\pm$ 4	229 $\pm$ 7	15.21 $\pm$ 1.12	14.71 $\pm$ 0.67	5.46 $\pm$ 0.28
3,8-диметокси-дibenзо-[b, d]-пиран-6-он	195 $\pm$ 6	226 $\pm$ 6	15.36 $\pm$ 1.33	14.23 $\pm$ 0.73	5.41 $\pm$ 0.34
3-гидроксидibenзо-[b, d]-пиран-6-он	199 $\pm$ 5	228 $\pm$ 7	15.64 $\pm$ 1.24	14.85 $\pm$ 0.76	5.92 $\pm$ 0.25

Было выявлено, что уровень инсулина был снижен у крыс с диабетом по сравнению с животными без диабета. Введение производных дибензо [b, d] пиран-6-она приводило к повышению уровня инсулина в плазме у крыс, инъецированных STZ. Максимальное повышение уровня инсулина в плазме наблюдалось в группе уролитина А. Введение крысам с диабетом производных дибензо [b, d] пиран-6-она увеличивало дозозависимым образом уровень общего гемоглобина (Hb) и снижало уровень гликозилированного гемоглобина (HbA_{1c}). Параметры недиабетических групп, получавших производные дибензо [b, d] пиран-6-она, были близки к контрольной группе, не демонстрируя влияния на здоровых животных. Таким образом, среди исследованных синтезированных производных дибензо [b, d] пиран-6-она уролитин А максимально снижал уровень глюкозы в сыворотке и нормализовал вес и параметры крови (содержание инсулина, общего и гликозилированного гемоглобина) на модели стрептозотоцин индуцированного диабета у крыс. Наблюдаемое повышение уровня инсулина в плазме указывает на то, что уролитин А стимулирует секрецию инсулина из существующих или регенерированных клеток. Полученные результаты показывают, что уролитин А может улучшить метаболические нарушения, вызванные диабетом. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования, чтобы лучше понять его потенциальное терапевтическое влияние и точный механизм действия.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-33-00414 мол а.

ЛИТЕРАТУРА

- World Health Organization. Global Report on Diabetes; WHO: Geneva, Switzerland, 2016.
- Xiao, J., Kai, G., Yamamoto, K., Chen, X. Advance in dietary polyphenols as α -glucosidases inhibitors: A review on structure-activity relationship aspect. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2013, 53, 818–836.
- Yuan, T., et al. Antidiabetic ellagitannins from pomegranate flowers: Inhibition of α -glucosidase and lipogenic gene expression. Org. Lett. 2012, 20, 5358–5361.
- Juśkiewicz et al. Blood glucose lowering efficacy of strawberry extracts rich in ellagitannins with different degree of polymerization in rats. Pol. J. Food Nutr. Sci. 2016, 66, 109–117.
- Tomás-Barberán, F.A., et al. Urolithins, the rescue of "old" metabolites to understand a "new" concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. Mol Nutr Food Res. 2017, 61, DOI: 10.1002/mnfr.201500901.
- Bialonska, D. et al. Urolithins, intestinal microbial metabolites of Pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. J Agric Food Chem. 2009, 57, 10181–10186.
- Wu, K.K., Huan, Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. Curr Protoc Pharmacol. 2008, Chapter 5, Unit 5.47.