

## ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕГЛИКИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ *IN VITRO*

**А. А. Спасов<sup>1, 2</sup>, А. И. Ращенко<sup>1, 3</sup>, А. А. Бригадирова<sup>1, 2</sup>**

<sup>1</sup>Волгоградский государственный медицинский университет,  
кафедра фармакологии,

<sup>2</sup>Волгоградский медицинский научный центр, лаб. экспериментальной фармакологии,  
<sup>3</sup>НИИ фармакологии, лаб. антиоксидантных средств

В ходе исследования воспроизведена экспериментальная модель изучения регликирующей активности химических соединений *in vitro*. Для подтверждения релевантности методики был протестирован известный разрыватель сшивок гликированных белков алагебриум в диапазоне концентраций 7—1,25 мМ и рассчитан его показатель полумаксимальной ингибирующей концентрации ( $IC_{50}$ ).

**Ключевые слова:** гликирование, конечные продукты гликирования (КПГ), сахарный диабет, алагебриум, аминоксидантин, модель *in vitro*.

## OPTIMIZATION OF METHOD *IN VITRO* FOR RE-GLYCATION ACTIVITY OF COMPOUNDS INVESTIGATION

**A. A. Spasov<sup>1, 2</sup>, A. I. Rashchenko<sup>1, 3</sup>, A. A. Brigadirova<sup>1, 2</sup>**

<sup>1</sup>Volgograd State Medical University, department of pharmacology,

<sup>2</sup>Volgograd Medical Research Centre,  
laboratory of experimental pharmacology,

<sup>3</sup>Research Centre of Pharmacology, laboratory of antioxidant agents

We reproduced an experimental model of studying *in vitro* re-glycation activity of compounds. The reliability of this method was confirmed by means of the tests employing alagebrium, a well-known advanced glycation end products (AGEs) breaker, in concentrations from 7 to 1,25 mM. The half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of this substance was calculated.

**Key words:** glycation, advanced glycation end products (AGEs), diabetes mellitus, alagebrium, aminoguanidine, model *in vitro*.

Хроническая гипергликемия является одним из наиболее характерных признаков всех типов сахарного диабета (СД) и приводит к усилению неферментативного гликозилирования белков организма и, как результат, образованию различных конечных продуктов гликирования (КПГ), в которых последовательно формируются необратимые сшивки. Гликирование служит основной причиной спонтанного нарушения структуры белков в организме, а на фоне СД гликирование усиливается за счет повышения уровня глюкозы и других сахаров в плазме крови [3]. КПГ стимулируют различные провоспалительные и сигнальные метаболические пути, а их избыточное накопление в организме рассматривается как главный фактор в патогенезе поздних осложнений СД, преимущественно диабетической ретинопатии и нефропатии, а также некоторых других заболеваний [1].

Так, в настоящее время выделяют несколько подходов к контролю продукции и разрушению КПГ. К первому относится предупреждение процесса гликирования белков и формирования в них поперечных сшивок, что приводит к замедлению прогрессирования диабетических осложнений. Так, к соединениям со свойством подавлять образование КПГ относится аминоксидантин, для которого, тем не менее, клинические испытания были прекращены главным образом из-за его способ-

ности ингибировать NO-синтазу и прооксидантной активности [2].

Другой подход основан на разрушении поперечных сшивок гликированных белков. В качестве соединений с таким механизмом действия предлагались бромид N-фенацилтиазолия и алагебриум, которые успешно прошли этап доклинических исследований, но по различным причинам их клинические испытания были прекращены [4, 6].

Таким образом, в настоящее время активно уделяется внимание поиску и разработке новых химических соединений, способных ингибировать образование КПГ или разрушать поперечные сшивки гликированных белков с целью создания лекарственных препаратов для профилактики развития поздних осложнений СД.

Существует различные как *in vitro*, так и *in vivo* методики для оценки способности соединений разрывать сшивки гликированных белков [4, 5]. Для начального этапа скрининга новых соединений одной из доступных моделей является исследование регликирования гликированного бычьего сывороточного альбумина (БСА) *in vitro*. Для регистрации продуктов в реакционной смеси используют метод определения специфической флуоресценции гликированного БСА при  $\lambda_{ex} = 370$  нм и  $\lambda_{em} = 440$  нм [5].

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Так, в настоящем исследовании представляется целесообразным настроить экспериментальную модель и оптимизировать условия выполнения метода [5] для изучения регликирующей активности химических соединений *in vitro*.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Способность соединений регликировать гликированный БСА *in vitro* изучали по модифицированному методу [5]. Реакцию гликирования моделировали в реакционной смеси, содержащей 400 мМ глюкозы («Агат-Мед», Россия) и 0,8 мг/мл БСА («BioWest», France), растворенных в 50 мМ фосфатном буферном растворе (рН 7,4). Для предупреждения бактериального роста в буферный раствор вносили азид натрия («Sigma», США) в конечной концентрации 0,02%-й. Смесь инкубировали при 60 °С в течение 40 часов. После окончания инкубации в пробирки типа эппендорф добавляли по 200 мкл смеси (БСА + глюкоза) с прибавлением 20 мкл 100%-й трихлоруксусной кислоты (ТХУ) («Fisher Scientific», США). После центрифугирования при 15000 об./мин в течение 4 мин при 37 °С в осажденный гликированный БСА добавляли до 300 мкл 50 мМ фосфатного буферного раствора (рН 7,4) и 30 мкл изучаемого вещества — реакционный объем 330 мкл — и инкубировали при 60 °С в течение 40 часов. Кроме того, было приготовлено аналогичное количество проб с негликированным неосажденным раствором БСА в количестве 300 мкл на каждую пробу, в которое также добавляли исследуемое вещество, и подвергали инкубации. Все вещества растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) («Fisher Scientific», США). В исследуемые образцы добавляли изучаемые вещества в необходимых конечных концентрациях, в контрольные образцы добавляли соответствующий объем растворителя. После окончания инкубации в пробирки добавляли 33 мкл 100 % ТХУ, затем центрифугировали при 15000 об./мин в течение 4 мин при 37 °С. Осажденные гликированный БСА и негликированный БСА растворяли в 1 мл фосфатного солевого буфера (рН 10,0) и определяли специфическую флуоресценцию пробных образцов на микропланшетном ридере («InfiniteM200», «Tecan», Австрия) при  $\lambda_{ex} = 370$  нм и  $\lambda_{em} = 440$  нм. Способность исследуемых соединений регликировать гликированный альбумин рассчитывали по формуле (1):

$$Ac (\%) = ((F_c - F_b) - (F_s - F_{sb})) / (F_c - F_b) * 10 \quad (1)$$

где  $F_c$  — флуоресценция инкубированного БСА, глюкозы и ДМСО (контроль);  $F_b$  — флуоресценция инкубированного БСА (негликированного);  $F_s$  — флуоресценция инкубированных БСА, глюкозы и исследуемого вещества;  $F_{sb}$  — флуоресценция инкубированного БСА (негликированного) и исследуемого вещества.

Для оценки адекватности воспроизведения метода был протестирован алагебриум (Kailu Xingli

Pharmaceutical Co., Ltd., China), раствор которого добавляли в экспериментальные образцы в концентрациях 7 мМ, 4,5 мМ, 3,5 мМ, 2,5 мМ и 1,25 мМ. Также на данной модели протестировали аминогуанидин («Sigma», США), известный ингибитор образования КПГ, в эквимольных концентрациях от 7 до 1,25 мМ.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с применением непараметрического критерия Манна-Уитни, анализа зависимости «доза-эффект» методом линейной регрессии и расчета полумаксимальной ингибирующей концентрации ( $IC_{50}$ ) в программе GraphPad Prism 6.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование гликированного БСА в реакционной смеси подтверждается наличием характерного пика флуоресценции контрольных образцов при  $\lambda_{ex} = 370$  нм и  $\lambda_{em} = 440$  нм.

В ходе проведенных исследований была подтверждена способность алагебриума, имеющая дозозависимый характер, регликировать БСА, полученный в результате описанной реакции. Показано, что активность алагебриума на данной модели в концентрациях 7 мМ, 4,5 мМ, 3,5 мМ, 2,5 мМ, 1,25 мМ составляет 52,4 %, 43,2 %, 30,9 %, 19,5 % и 17,9 %, соответственно (табл.).

На основании полученных данных также был рассчитан параметр  $IC_{50}$  алагебриума, который составил 6,35 мМ (рис.), что соответствует ранее опубликованным данным об активности данного соединения [4]. При этом оптимальной для сравнения эффектов изучаемых веществ между собой в скрининговых исследованиях оказалась концентрация 5 мМ.

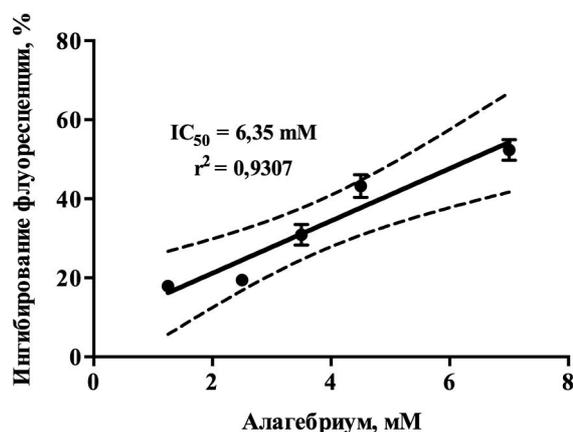


Рис. Регликирующая активность алагебриума *in vitro*. Значение  $IC_{50}$

В то же время при тестировании известного ингибитора гликирования белков аминогуанидина на данной модели в эквимольных концентрациях с алагебриумом у него не было обнаружено характерных для алагебриума регликирующих свойств (табл.).

## Регликирующая активность алагебриума и аминоксантидина *in vitro* в широком диапазоне концентраций 7—1,25 мМ

Вещество	Регликирующая активность, $\Delta$ % ( $M \pm m$ )					IC <sub>50</sub>
	7 мМ	4,5 мМ	3,5 мМ	2,5 мМ	1,25 мМ	
Алагебриум	52,35 ± 2,62*	43,23 ± 2,89*	30,88 ± 2,62*	19,46 ± 0,33*	17,87 ± 0,47*	6,35 мМ
Аминоксантидин	2,81 ± 0,28	2,76 ± 0,20	2,03 ± 0,78	1,89 ± 0,55	1,55 ± 0,25	—

\*Статистически значимо по отношению к контролю, тест Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

Разработанная методика была валидирована по показателям воспроизводимости и точности.

**Воспроизводимость метода.** Контроль воспроизводимости методики проводили путем многократного тестирования препарата сравнения алагебриума. В разные дни проводили по 3—5 измерений одной и той же субмаксимальной концентрации препарата (5 мМ). Полученные результаты были близкими (коэффициент вариации ± 1,05 %).

**Точность метода.** Внутрилабораторный разброс данных (среднее ± 3SD) для субмаксимальной концентрации алагебриума, протестированной в разные дни, составил 46,02 % ± 3\*0,48 % = 44,58 — 47,46. В результате 95,33 % измеренных величин находятся в пределах среднего ± 3SD.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования была настроена методика для изучения регликирующей активности соединений *in vitro* и доказана ее релевантность. Определена оптимальная доза для тестирования соединений с предполагаемой регликирующей активностью, которая составила 5 мМ. На данной модели было подтверждено отсутствие регликирующих свойств у ингибитора образования КПГ аминоксантидина.

Данная воспроизведенная модель является адекватной и в дальнейшем может служить для оценки регликирующей активности соединений.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М. И. // Сахарный диабет. — 2002. — Т. 5 (4). — С. 8—16.
2. Ленская К. В., Спасов А. А., Чепляева Н. И. // Вестник ВолгГМУ. — 2011. — Т. 40 (4). — С. 10—18.
3. Ahmed N., Thornalley P. J. // Русский медицинский журнал. — 2009. — Т. 17 (9). — С. 642—650.
4. Kim J., Kim C.-S., Moon M. K., Kim J. S. // Eur. J. Pharmacol. — 2015. — Feb. — Vol. 748. — P. 108—114.
5. Ratnasooriya W. D., Abeysekera W. K. S. M., Muthunayake T. B. S., Ratnasooriya C. D. T. // Trop. J. Pharm. Res. — 2014. — Vol. 13 (4). — P. 567—571.
6. Richardson M. A., Furlani R. E., Podell B. K., et al. // Tetrahedron Letters. — 2015. — Vol. 56 (23). — P. 3406—3409.

### Контактная информация

**Бригадирова Анастасия Андреевна** — ассистент каф. фармакологии ВолгГМУ, м. н. с. лаб. экспериментальной фармакологии ГБУ ВМНЦ, e-mail: a.brigadirova@gmail.com