

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ ИЗ РЯДА ЗАМЕЩЕННЫХ 1,3,4-6Н-ТИАДИАЗИНОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

© 2019 г. И. Ф. Гетте^{1,2*}, В. В. Емельянов¹, А. В. Белоусова^{1,2},
И. Г. Данилова^{1,2}, Л. П. Сидорова¹, Т. А. Цейтлер¹

*E-mail: i.goette@yandex.ru

¹ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

²ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

Поступила: 26.05.2019. Принята: 29.06.2019

Проведено исследование влияния соединения L-17 из ряда замещенных 1,3,4-6Н-тиадиазинов, на цитокиновый спектр плазмы крови крыс при моделировании сахарного диабета 2 типа. Были использованы дозы никотинамида и стрептозотоцина соответственно 110 мг/кг и 65 мг/кг. Введение L-17 диабетическим крысам сопровождалось уменьшением гипергликемии и частичной коррекцией дисбаланса в содержании провоспалительных и противовоспалительных цитокинов: снижением уровня IL-1 α и IFN- γ без нормализации уровня IL-10 и TGF- β 1.

Ключевые слова: цитокины, сахарный диабет 2 типа, 1,3,4-6Н-тиадиазины

DOI: 10.31857/S102872210007234-2

Адрес: 620049, Свердловская область, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106, ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, лаборатория морфологии и биохимии, Гетте Ирина Федоровна. Тел./факс: +7(343)3740070.

E-mail: i.goette@yandex.ru

Авторы:

Гетте И. Ф., к.б.н., старший научный сотрудник ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия; старший научный сотрудник кафедры иммунохимии Химико-технологического института ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Емельянов В. В., к.м.н., доцент кафедры иммунохимии, доцент кафедры медицинской биохимии и биофизики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Белоусова А. В., младший научный сотрудник ФБГУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Екатеринбург, Россия; лаборант-исследователь кафедры иммунохимии, ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Данилова И. Г., д.б.н., доцент, зав. лабораторией морфологии и биохимии ИИФ УрО РАН, Екатеринбург, Россия; зав. кафедрой медицинской биохимии и биофизики «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Сидорова Л. П., к.х.н., доцент кафедры безопасности жизнедеятельности ФГАОУ ВО «Уральский федеральный уни-

верситет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия;

Цейтлер Т. А., к.х.н., м.н.с. кафедры органической и биомолекулярной химии ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Екатеринбург, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Возрастающая пандемическая распространенность сахарного диабета в современном мире, обусловленная, прежде всего, ростом заболеваемости сахарным диабетом второго типа (СД 2) [1], диктует необходимость поиска новых противодиабетических средств. В патогенезе диабета как 1, так и 2 типов имеет место дисбаланс в продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [2]. Так, у пациентов с СД 2 содержание TNF- α и IL-1 β было повышено, тогда как уровень IL-10 снижен [3]. Семейство IL-1 играет центральную роль в регуляции иммунных и воспалительных реакций, индуцирует высвобождение множества вторичных медиаторов воспаления, включая простагландины, цитокины и хемокины, в том числе

при СД 2 [4]. Отмечают роль IL-1 α и IL-1 β при таком хроническом осложнении СД 2, как ретинопатия [5]. Установлено, что повышение уровня TNF α сопровождается уменьшением синтеза инсулиновых рецепторов и снижением чувствительности инсулинзависимых тканей к инсулину. Цитокины TNF α и IL-6 способны связываться с инсулиновыми рецепторами, нарушая сигнальные пути инсулина, что также вносит вклад в развитие инсулинорезистентности [6]. Исследования в клинике и эксперименте показали, что увеличение содержания TNF- α в плазме крови пациентов с сахарным диабетом 1 и 2 типа и экспериментальных животных с аллоксановым и стрептозотоциновым диабетом коррелирует с уровнем гипергликемии [6, 7].

У пациентов с СД 2 обнаружено увеличение уровня IFN- γ [8]. IFN γ наряду с другими провоспалительными цитокинами (IL-1 β , TNF- α) участвует в апоптозе β -клеток островков поджелудочной железы [2] и формировании диабетической нефропатии [9].

Интерлейкин-10 является противовоспалительным цитокином. К эффектам IL-10 относятся: подавление синтеза провоспалительных цитокинов (FNO α , IL-1 β , IFN γ), презентация антигенов и активация CD4⁺ Т-клеток. Снижение секреции IL-10 связано с ожирением, метаболическим синдромом и СД 2 [10]. Предполагается, что IL-10 играет защитную роль при СД 2.

Семейство трансформирующих ростовых факторов бета (TGF- β) контролирует пролиферацию, клеточную дифференцировку и другие функции в большинстве клеток. Регулируя пролиферацию и дифференцировку клеток, TGF- β может способствовать регенерации β -клеток. В то же время известно участие этого цитокина в формировании фиброза миокарда [11] и нефропатии [12] у пациентов с СД 2.

Длительная гипергликемия сопровождается повсеместным накоплением гликированных белков, в отношении которых также осуществляются аутоиммунные реакции, сопровождающиеся системным воспалительным процессом, что приводит к ряду хронических осложнений, таких, как микроангиопатии, нефропатия, ретинопатия [7]. Таким образом, хроническое воспаление и дисбаланс между про- и противовоспалительными цитокинами могут быть триггерами повреждения β -клеток и инсулинорезистентности при СД 2, а также могут усиливаться по мере прогрессирования заболевания. Снижение выраженности воспалительного процесса, в том

числе при действии антиоксидантов, представляет собою перспективный подход к лечению инсулинорезистентности у больных СД 2 [8].

В наших предыдущих исследованиях показана возможность совместной коррекции гипергликемии, неферментативного гликирования белков и оксидативного стресса при экспериментальном сахарном диабете соединением L-17 из ряда замещенных 1,3,4-6H-тиадиазинов [13]. Также при моделировании сахарного диабета 1 типа введением аллоксана нами было выявлено снижение содержания провоспалительных цитокинов при действии соединения L-17 [14]. Однако влияние замещенных 1,3,4-6H-тиадиазинов на биохимические механизмы патогенеза и цитокиновый профиль при экспериментальном СД 2 не исследовано.

Цель исследования – оценить возможность коррекции показателей нарушенного метаболизма и уровня цитокинов плазмы крови крыс со стрептозотоцин-никотинамидной моделью сахарного диабета 2 типа при действии соединения L-17 из ряда замещенных 1,3,4-6H-тиадиазинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН (г. Екатеринбург). Эксперимент на животных был выполнен в соответствии с принципами Директивы 2010/63/ЕС Европейского парламента и Европейского Совета (Официальный журнал Европейского союза, 2010 г.). Животные содержались в равных условиях (12 часов света / 12 часов темноты), по 5 крыс в клетке, получали стандартный корм. Было использовано 30 крыс-самцов линии Wistar в возрасте 12 недель весом 220–250 г. Сформировано 3 группы животных по 10 крыс: 1 – интактная, 2 – СД 2, 3 – СД 2 и инъекции соединения L-17.

Для создания модели СД 2 внутрибрюшинно вводили раствор никотинамида в воде (“Sigma”, США) 110 мг/кг, через 15 минут также внутрибрюшинно вводили раствор стрептозотоцина (“Sigma”, США) в цитратном буфере 65 мг/кг [15]. Животным группы 3 после моделирования СД 2 осуществляли внутримышечные инъекции раствора соединения L-17 в новокаине из расчета 40 мг/кг, 12 инъекций в течение месяца. Животных всех групп выводили из эксперимента на 30-е сутки посредством внутримышечного введения пентобарбитала натрия 40 мг/кг. В плазме крови крыс определяли содержание

глюкозы глюкозооксидазным методом (Витал Диагностикс, СПб), в цельной крови – содержание гликированного гемоглобина методом аффинной гель-хроматографии с использованием набора реактивов ГЛИКОГЕМОТЕСТ (ЭЛТА, Москва). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре DU-800 (Beckman, США). Методом ИФА в плазме крови определяли содержание цитокинов (наборы «ThermoFisher», США) с использованием прибора LAZURITE AUTOMATED ELISA SYSTEM.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программ Statistica 6.0 (Stat. Soft. Inc.) и программы Microsoft Excel 2003. При проверке статистических гипотез использовался уровень значимости 5% ($p < 0,05$). Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее, m – ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Моделирование СД 2 способствовало увеличению содержания глюкозы в плазме крови крыс почти в 2 раза по сравнению с показателем интактной группы. Гипергликемия в группе 2 сопровождалась накоплением гликированного гемоглобина (Таблица 1). В группе крыс 3 с моделированием СД 2 и введением соединения L-17 выявлено достоверное снижение содержания глюкозы и нормализация уровня гликированного гемоглобина относительно соответствующих показателей крыс контрольной группы 2 (Таблица 1).

В плазме крови крыс группы СД 2 было обнаружено небольшое, но статистически значимое увеличение содержания провоспалительного цитокина IL-1 α и значительное (почти в 7 раз) увеличение IFN- γ относительно показателей

интактной группы, в то же время содержание TNF- α после моделирования СД 2 не превышало норму (Таблица 1). Уровень противовоспалительных цитокинов TGF- β 1 и IL-10 у диабетических крыс был ниже, чем соответствующие показатели интактных животных, особенно существенным было уменьшение IL-10, почти в 7 раз относительно нормы.

После инъекций L-17 наблюдали снижение содержания IL-1 α и IFN- γ по сравнению с показателями диабетических крыс. Уровень TNF- α у диабетических леченых и нелеченых крыс достоверно не отличался от показателя интактных животных. Содержание противовоспалительных цитокинов в группе 3 после действия L-17 не увеличилось по сравнению с показателем диабетических крыс.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты эксперимента свидетельствуют о способности соединения L-17 снижать гипергликемию. Аналогичный эффект данного соединения на модели аллоксанового диабета был связан с увеличением концентрации инсулина и влиянием на клеточность островков Лангерганса поджелудочной железы [13].

Увеличение содержания провоспалительных цитокинов IL-1 α и IFN- γ в плазме крови крыс группы 2 указывает на наличие воспалительного процесса, не прекращающегося через месяц после моделирования СД 2. Отсутствие повышенного количества TNF- α в плазме крови диабетических крыс может быть связано с особенностью стрептозотоцин-никотинамидной модели СД 2, не предполагающей развития ожирения. Известно, что адипоциты при ожирении вносят значительный вклад в продукцию

Таблица 1. Показатели в крови экспериментальных животных

Показатель	Интактная группа	СД2	СД+ L17
Глюкоза, ммоль/л	5,1 \pm 0,2	12,1 \pm 1,0*	8,8 \pm 0,7* ²
HbA1c, %	4,3 \pm 0,3	6,6 \pm 0,5*	5,5 \pm 0,5
IL-1 α , пг/мл	300,4 \pm 8,4	335,0 \pm 10,2*	315,1 \pm 16,5
TNF- α , пг/мл	51,1 \pm 1,5	50,7 \pm 5,7	48,6 \pm 3,6
IFN- γ , пг/мл	133,5 \pm 12,1	923,1 \pm 177,2*	72,2 \pm 19,0* ²
TGF- β 1, пг/мл	234,9 \pm 14,6	144,8 \pm 18,4*	111,5 \pm 5,2*
IL-10, пг/мл	7262,5 \pm 220,5	1058,7 \pm 263,0*	688,2 \pm 99,0*

Примечание: * – различия с показателем группы интактных животных достоверны при $P < 0,05$; ² – различия с показателем группы СД2 достоверны при $P < 0,05$.

TNF- α и формирование инсулинорезистентности [1, 6, 7].

Коррекция уровня провоспалительных цитокинов после введения соединения L-17 диабетическим крысам свидетельствует о снижении выраженности воспалительного процесса. В механизмах этого явления могут иметь значение как выявленное ранее антиоксидантное действие соединения L-17 [13], так и воздействие на макрофаги. Отсутствие увеличения концентрации противовоспалительного цитокина IL-10 у диабетических крыс после воздействия L-17 свидетельствует о недостаточно полной коррекции системного воспалительного ответа. В сочетании со снижением уровня TGF- β 1 это может приводить к недостаточности регенераторного процесса в панкреатических островках, что требует дальнейших исследований. Однако уменьшение содержания провоспалительных цитокинов после действия L-17 способствует частичной коррекции дисбаланса провоспалительных-антивоспалительных цитокинов.

ВЫВОДЫ

1. Соединение L-17 из ряда замещенных 1,3,4-6H-тиадиазинов приводит к статистически значимому снижению уровня гипергликемии и гликированного гемоглобина у крыс со стрептозотоцин-никотинамидной моделью сахарного диабета 2 типа.

2. В результате введения соединения L-17 диабетическим крысам в плазме крови снижается количество провоспалительных цитокинов IL-1 α и IFN- γ и антивоспалительного цитокина IL-10, что свидетельствует об уменьшении воспалительного ответа.

3. Содержание антивоспалительных цитокинов у диабетических крыс после действия L-17 не нормализуется, но уменьшение количества провоспалительных цитокинов частично корректирует дисбаланс.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 15-16-00039 П

Работа выполнена по теме Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации АААА-А18-118020590107-0

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Kazemian P., Wexler D.J., Fields N.F., Parker R.A., Zheng A., Walensky R.P.* Development and validation of PREDICT-DM: A new microsimulation model to project and evaluate complications and treatments of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Technol. Ther.* 2019, 21(6), 344–355.
2. *Cieslak M., Wojtczak A., Cieslak M.* Role of pro-inflammatory cytokines of pancreatic islets and prospects of elaboration of new methods for the diabetes treatment. *Acta Biochim. Pol.* 2015, 62(1), 15–21.
3. *Tong H. V., Luu N. K., Son H. A., Hoan N. V., Hung T. T., Velavan T. P., Toan N. L.* Adiponectin and pro-inflammatory cytokines are modulated in Vietnamese patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes Investig.* 2017, 8(3), 295–305.
4. *Banerjee M., Saxena M.* Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes. *Clin. Chim. Acta.* 2012, 413(15–16), 1163–70.
5. *Reverter J. L., Nadal J., Ballester J., Ramió-Lluch L., Rivera M. M., Fernández-Novell J. M., Elizalde J., Abengoechea S., Rodríguez J. E.* Diabetic retinopathy is associated with decreased tyrosine nitrosylation of vitreous interleukins IL-1 α , IL-1 β , and IL-7. *Ophthalmic Res.* 2011, 46(4), 169–74.
6. *Беспалова И. Д., Рязанцева Н. В., Калюжин В. В., Афанасьева Д. С., Мурашев Б. Ю., Осихов И. А.* Системное воспаление в патогенезе метаболического синдрома и ассоциированных с ним заболеваний // Сибирский медицинский журнал. 2013, № 2, 5–9. [*Bespalova I. D., Ryazanceva N. V., Kalyuzhin V. V., Afanas'eva D. S., Murashev B. Yu., Osikhov I. A.* Systemic inflammation in the pathogenesis of metabolic syndrome and associated diseases // *Siberian Medical Journal.* 2013, № 2, 5–9].
7. Осложнения сахарного диабета: лечение и профилактика. Под ред. И. И. Дедова, М. В. Шестаковой. М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство». 2017, 744 с. [Complications of diabetes: treatment and prevention. Ed. I. I. Dedov, M. V. Shestakova. M.: LLC Publisher “Medical Information Agency” 2017, 744 p.]
8. *Telikani Z., Sheikh V., Zamani A., Borzouei S., Salehi I., Amirzargar M. A., Alahgholi-Hajibehzad M.* Effects of sitagliptin and vitamin D3 on T helper cell transcription factors and cytokine production in clinical subgroups of type 2 diabetes mellitus: highlights upregulation of FOXP3 and IL-37. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2019, 41(2), 299–311.
9. *Nosratabadi R., Arababadi M. K., Hassanshahi G., Yaghini N., Pooladvand V., Shamsizadeh A., Zarandi E. R., Hakimi H.* Evaluation of IFN-gamma serum level in nephropathic type 2 diabetic patients. *Pak. J. Biol. Sci.* 2009, 12(9), 746–9.
10. *Canecki-Varzic S., Prpic-Krizevac I., Mihaljevic S., Bilic-Curcic I., Alkhamis T., Wagner J., Skrlec I., Barbic J.* Association between interleukin-10 gene (–1082g/A) polymorphism and type 2 diabetes, diabetes-related traits, and microvascular complications in the Croatian population. *Ophthalmic Res.* 2011, 46(4), 169–74.
11. *Yue Y., Meng K., Pu Y., Zhang X.* Transforming growth factor beta (TGF- β) mediates cardiac fibrosis and induces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2017, 133, 124–130.
12. *Zhang Y., Wang B., Guo F., Li Z., Qin G.* Involvement of the TGF β 1-ILK-Akt signaling pathway in the effects of hesperidin in type 2 diabetic nephropathy. *Biomed. Pharmacother.* 2018, 105, 766–772.

13. *Emelianov V. V., Savateeva E. A., Sidorova L. P., Tseitler T. A., Maksimova N. E., Mochulskaya N. N., Chupakhin O. N., Chereshnev V. A., Gette I. F., Bulavintseva T. S. & Smirnykh S. E.* 2-Morpholino-5-Phenyl-6H-1,3,4-Thiadiazine corrects metabolic disorders during the development of alloxan diabetes mellitus in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016, V. 162, № 1, 35–37.
14. *Danilova I. G., Emelianov V. V., Gette I. F., Medvedeva S. Yu., Bulavintseva T. S., Chereshneva M. V., Sidorova L. P., Chereshnev V. A., Sokolova K. V.* Cytokine regulation of regenerative processes in pancreatic gland in alloxan-induced diabetic rats, and its correction by 1,3,4-Thiadiazine composition and lipoic acid. *Medical Immunology (Russia)*. 2018, V. 20, Issue 1, 35–44.
15. *Спасов А. А., Воронкова М. П., Снигур Г. Л., Чепляева Н. И., Чепурнова М. В.* Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 // *Биомедицина*. 2011, № 3, 12–18. [*Spasov A. A., Voronkova M. P., Snigur G. L., Cheplyaeva N. I., Chepurnova M. V.* Experimental model of type 2 diabetes mellitus // *Bio-medicine*. 2011, № 3, 12–18.]

THE INFLUENCE OF A NUMBER OF SUBSTITUTED 1,3,4-6H-THIADIAZINES ON THE CONTENT OF CYTOKINES IN BLOOD PLASMA OF RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS TYPE 2

© 2019 I. F. Gette^{1,2*}, V. V. Emelianov¹, A. V. Belousova^{1,2}, I. G. Danilova^{1,2}, L. P. Sidorova¹, T. A. Tseitler¹

*E-mail: i.goette@yandex.ru

¹Ural Federal University named after the first president of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia;

²Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia

Received: 26.05.2019. Accepted: 29.06.2019

A study was carried out to investigate the impact of the L-17, a representative of 1,3,4-6H-thiadiazines, on the cytokine spectrum of rat blood plasma when simulating type 2 diabetes mellitus. Doses of nicotinamide and streptozotocin were respectively, 110 mg / kg and 65 mg / kg. The introduction of L-17 to diabetic rats was accompanied by a decrease in hyperglycemia and a partial correction of the imbalance in the content of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines: a decrease in the level of IL-1 α and IFN- γ without normalization of the IL-10 and TGF- β 1 level.

Key words: cytokines, type 2 diabetes, 1,3,4-6H-thiadiazines

Authors:

Gette I. F., ☒ PhD, Senior Researcher, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; Senior Researcher, Department of Immunochemistry, Institute of Chemical Technology, Ural Federal University named after the first president of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia;

620049, Sverdlovsk Region, Yekaterinburg, st. Pervomaiskaya 106, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Laboratory of Morphology and Biochemistry. Tel./fax: +7 (343) 3740070. E-mail: i.goette@yandex.ru;

Emelianov V. V., PhD, Associate Professor, Department of Immunochemistry, Associate Professor, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia;

Belousova A. V., Junior Researcher, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia; Laboratory Researcher, Department of Immunochemistry, Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia;

Danilova I. G., Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Head of Laboratory of Morphology and Biochemistry IIF UB RAS, Head of the Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Ural Federal University named after the first president of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia;

Sidorova L. P., Ph.D., Department of Life Safety, Ural Federal University named after the first President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia;

Tseitler T. A., Ph.D., Associate Professor of the Department of Organic and Biomolecular Chemistry, Ural Federal University named after the first president of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg, Russia.