



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **75566**

(13) **U**

(51) МПК

**C07K 5/06** (2006.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

**G01N 33/49** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

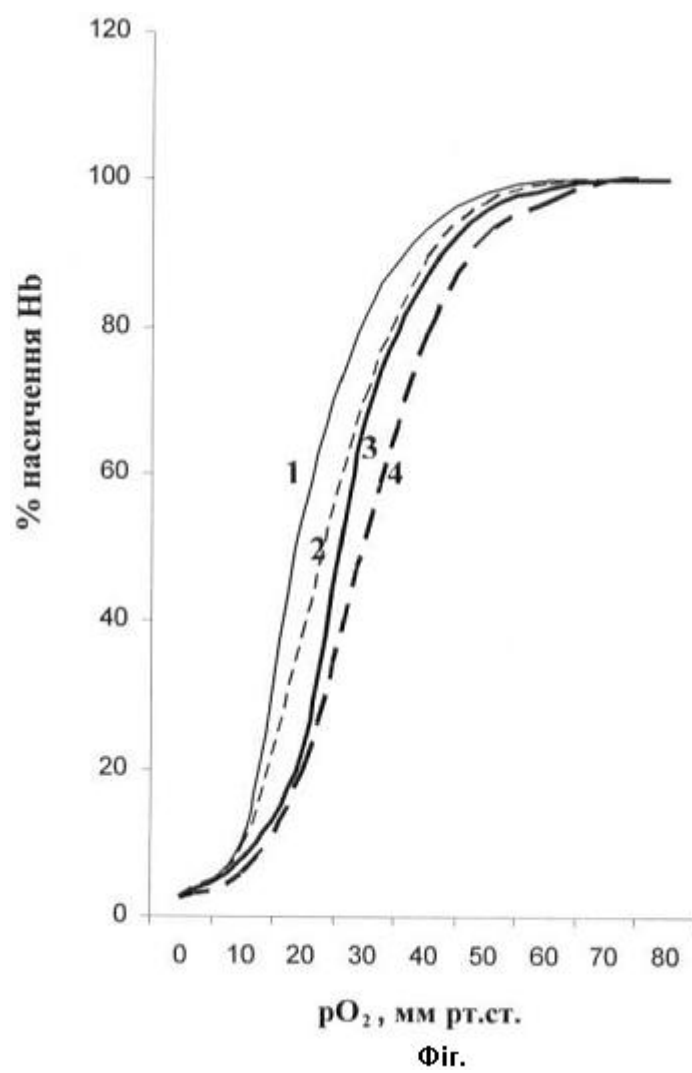
<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2012 05006</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Сибірна Наталія Олександрівна (UA), Бурда Володимира Адамівна (UA), Люта Мар'яна Ярославівна (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>23.04.2012</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.12.2012</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА, вул. Університетська, 1, м. Львів, 79000 (UA)</b>
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.12.2012, Бюл.№ 23</b>	

**(54) СПОСІБ ПРОФІЛАКТИКИ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ ТА ЙОГО УСКЛАДНЕНЬ**

**(57) Реферат:**

Спосіб профілактики цукрового діабету та його ускладнень включає в себе введення селективного інгібітору індукцйбельної NO-синтази і неферментативного глікозилювання. Як інгібітор використовують водний розчин аміногуанідину, який вводять per os 1г на 1л води цілодобово упродовж 3-4 тижнів діабетичним щурам.

**UA 75566 U**



Корисна модель належить до медицини, зокрема до ендокринології, і стосується лікування діабету та зв'язаних з ним ускладнень за допомогою препарату, який інгібує неферментативне глікозилювання білків і може бути використаний для зменшення чи усунення проявів окисного стресу за даної патології.

Відомий спосіб використання інгібітору NO-синтази - L-NNA [Висмонт Ф.И., Степанова Н.А. О роли монооксида азота в регуляции детоксикационной функции печени, тиреоидного статуса и температуры тела при эндотоксической лихорадке / БМЖ. - 2003] за яким вводять інгібітор NO-синтази - L-NNA внутрішньоочередно одноразово у дозі 20 мг щурам з лихоманкою. Це послаблює лихоманкову реакцію на ендотоксин, попереджає активацію детоксикаційної функції печінки і системи гіпофіз - щитовидна залоза. Блокатор NO-синтази в організмі послаблює гіпотермію, зміну вмісту загального білка і альбумінів, продуктів перекисного окиснення ліпідів, а також тиреоїдного статусу, викликаного гепатотропним ядом  $CCl_4$ . Проте він є неселективний інгібітор NO-синтази.

Найближчим за технічною суттю і дією - прототипом - є спосіб за яким вводять інгібітор NO-синтази - L-NAME(N-нітро-L-аргінинметилестер) цілодобово per os, як водний розчин 70 мг на 1 л води протягом 3-4 тижнів діабетичним щурам (Патент: Сибірна Н.О., Бурда В.А. "Спосіб профілактики цукрового діабету та його ускладнень", № 46519, 25.12.2009 р., Львівський національний університет імені Івана Франка). Введення цього препарату забезпечує позитивний ефект за рахунок зниження активності NO-синтази і кінцевих метаболітів оксиду азоту нітритів і нітратів.

Оскільки інгібітор L-NAME є неселективним інгібітором родини NO -синтаз, то за умов цукрового діабету, коли значних змін зазнає індукційна NO-синтаза, його використання є неефективним.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалити спосіб профілактики цукрового діабету та його ускладнень шляхом використання речовини селективного інгібітора індукційної NO-синтази, а також неферментативного глікозилювання - аміногуанідину на NO-систему організму, що дасть можливість послабити токсичну дію NO та реакцію неферментативного глікозилювання.

Поставлена задача вирішується так, що у способі профілактики цукрового діабету та його ускладнень, що містить введення інгібітору індукційної NO-синтази і неферментативного глікозилювання, при цьому як інгібітор використовують водний розчин аміногуанідину 1 г на 1 л води, що вводять цілодобово per os упродовж 3-4 тижнів діабетичним щурам.

Розвитку оксидативного стресу за умов цукрового діабету сприяють численні порушення метаболізму, перш за все, гіперглікемія і дисліпідемія, ендокринні розлади, зумовлені патологічними змінами секреції інсуліну, патоімунні реакції, а також вичерпання антиоксидантного резерву. Разом з тим, вільні радикали можуть сприяти розвитку гіперглікемії. Підвищення рівня NO сприяє ушкоджуючій дії продуктів перекисного окиснення ліпідів і суттєво підсилює ефект вільнорадикального окиснення. Ця обставина диктує необхідність пошуку і застосування усе нових антиоксидантів у комплексній терапії цукрового діабету.

На пізніх стадіях діабету оксидативний стрес стає однією із ключових ланок патогенезу різних ускладнень діабету, оскільки на його фоні відбувається накопичення токсичних продуктів у результаті деструкції білків і нуклеотидів, а також перекисне окиснення ліпідів з наступним пошкодженням клітинних компонентів, вичерпання антиоксидантної системи, активація факторів транскрипції, перш за все NF- $\kappa$ B, гіперактивація апоптозу, порушення синтезу простаноїдів і системи зсідання крові [Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., 2000].

У хворих людей цукровим діабетом та із діабетичними ускладненнями порушується NO -система організму. Гіперглікемія, яка виникає при діабеті, призводить до зростання рівня глікозильованого гемоглобіну, котрий сприяє, поряд з іншими факторами, розвитку гіпоксії, оскільки глікозильований гемоглобін у фізіологічних умовах має підвищену спорідненість до кисню. Висока спорідненість глікозильованого гемоглобіну до кисню пов'язана з присутністю молекули глюкози на N-кінцях  $\beta$ -ланцюгів глобіну, що робить неможливим взаємодію його з 2,3-дифосфоліцератом, який є фактором що знижує кисневий афінитет. Глікозильований гемоглобін утворює міцний зв'язок з киснем і сприяє розвитку тканинної гіпоксії.

Відомо, що для захисту клітин від можливих пошкоджень, викликаних надмірним утворенням активних кисневих молекул, існують численні антиоксидантні ферментні системи. Утворення внутрішньоклітинних ферментів антиоксидантного захисту як відповідь на високий рівень глюкози може бути дефектним у пацієнтів, хворих на цукровий діабет 1-го типу з нефропатією [Пляйфер А.И., Солун М.Н., 1993].

Гіперглікемія не лише провокує надлишкове утворення вільних радикалів кисню, але і знижує активність захисних механізмів внаслідок процесу неферментативного глікозилювання

антиоксидантних ферментів. Глікозилювання білків - неферментативне приєднання глюкози до аміногруп білка є одним із важливих механізмів у формуванні судинних ускладнень цукрового діабету. При інкубації білка з глюкозою протягом короткого проміжку часу, за декілька годин утворюються зворотні основи Шиффа. При подальшій експозиції з глюкозою протягом тижнів вони перетворюються у стабільні сполуки, такі як продукти Амадорі або кетоаміни - зворотні продукти раннього глікозилювання. Їх концентрація підвищується з ростом гіперглікемії та тривалістю інкубації, включення у структуру білків швидко досягає стійкого "плато". За умов тривалої гіперглікемії продукти Амадорі перебудовуються з утворенням стабільних комплексів - AGEs. Ці сполуки накопичуються на білках тривалого існування, призводячи до їх структурних та функціональних пошкоджень. Зниження рівня глікозилюваного гемоглобіну у хворих на діабет лише на 1 % знижує ризик виникнення мікросудинних уражень на 37 %, уражень периферійних судин - на 43 %, летальність, пов'язану з цукровим діабетом, - на 21 %.

З літературних джерел відомо, що аміногуанідин має протекторну дію при розвитку нефропатії при стрептозотоциновому діабеті, а також може виступати у ролі фармакологічного інгібітору ретинопатії за умов алоксанового діабету. Також він є селективним інгібітором індукцйбельної NO-синтази - однієї з ізоформ сім'ї синтаз оксиду азоту і антиоксидантом.

Авторами вперше запропоновано як селективний інгібітор індукцйбельної NO-синтази та інгібітор неферментативного глікозилювання білків використати аміногуанідин, який незворотно реагує з карбоксильними групами зворотних продуктів глікозилювання, а саме шифові основи та продукти Амадорі, чим, власне, і припиняє процес глікозилювання і тим самим корегує паталогічний стан, пов'язаний з цими процесами в організмі.

Фіг. 1. Типові криві оксигенації гемоглобіну щурів у нормі та за умов експериментального цукрового діабету на фоні впливу аміногуанідину, де 1 - діабет; 2 - діабет + аміногуанідин; 3 - контроль; 4 - контроль + аміногуанідин.

Спосіб можна проілюструвати наступними прикладами.

У досліджах використовують кров щурів із експериментальним стрептозотоциновим діабетом. Діабет викликають введенням стрептозотину у розрахунок 7 мг на 100 г маси тіла внутрішньоочеревно. Водним розчином аміногуанідину у концентрації 1 г/л поють щурів протягом 30 днів.

Вміст глікозилюваного гемоглобіну в еритроцитах визначають колориметричним способом, який ґрунтується на кислотному гідролізі кетоамінного зв'язку за присутності щавелево-оцтової кислоти (Галенок В.А., Боднар П.Н., 1989). Спорідненість гемоглобіну до кисню визначають спектрофотометричним способом побудови кривих кисневої рівноваги гемоглобіну [Іванов Ю.І., 1975]. Дослідження антиоксидантної системи ферментів та продуктів перекисного окиснення ліпідів проводять, визначаючи супероксиддисмутазну активність [Костюк В.А., 1990], активність каталази [Королюк М.А., Іванова Л.І., 1988], глутатіонпероксидази (Моин В.І., 1986), вміст ТБК-позитивних продуктів [Тимирбулатов Р.Р., Селезнев Е.І., 1981], активність NO-синтази (Онуфрієв М.В., Гуляєва Н.В., 1995).

Глікозилюваний гемоглобін характеризується підвищеною спорідненістю до кисню, тобто дисоціація і вивільнення кисню в тканинах сповільнюється, що поряд з іншими факторами сприяє розвитку тканинної гіпоксії. Універсальним показником ступеня спорідненості гемоглобіну до кисню є параметр  $P_{50}$ , тобто такий парціальний тиск кисню, при якому оксигенується 50 % гемоглобіну. Відомо, що NO може впливати на спорідненість гемоглобіну до кисню. Met-Hb і SNO-Hb підвищують її, а NO-Hb знижує. Зв'язування NO з оксигемоглобіном є кооперативним, його окиснення у метгемоглобін при фізіологічних умовах обмежене і переважають реакції, які ведуть до посиленого утворення  $HbFe^{2+}NO$ . Тому авторами проводились дослідження впливу аміногуанідину на стан киснево-транспортної системи еритроцитів в нормі та за умов цукрового діабету, оскільки він є селективним інгібітором індукцйбельної NO-синтази, а також інгібітором неферментативного глікозилювання. Також досліджувався вміст глікозилюваного гемоглобіну як маркера глікемії за даних умов. В результаті проведених досліджень отримують типові криві оксигенації гемоглобіну у досліджуваних групах тварин, які наведені на фіг. 1.

Аналіз кривих дисоціації оксигемоглобіну демонструє чітко виражений зсув кривої дисоціації вліво і зниження  $P_{50}$  у щурів з експериментальним цукровим діабетом. Виявлено також достовірне зростання вмісту глікозилюваного гемоглобіну, що є одним з факторів, що викликає ці зміни (табл. 1.). Введення аміногуанідину контрольним щурам викликає зсув кривої дисоціації вправо порівняно з контролем, що свідчить про зменшення спорідненості гемоглобіну до кисню ( $P_{50}=29,31\pm 1,39$ ). При дії аміногуанідину за умов цукрового діабету нормалізуються киснево-транспортні функції гемоглобіну, тобто відбувається зсув кривої вправо порівняно з діабетом і

наближення до контролю (фіг. 1), вміст глікозильованого гемоглобіну при цьому достовірно зменшується (табл. 1). Значення  $P_{50}$  наведено у табл. 1.

Табл. 1.

Напівнасичення гемоглобіну киснем та вміст глікозильованого гемоглобіну ( $M \pm t$ , $n=8-10$ )		
Варіант досліджу	$P_{50}$ , мм рт. ст..	Вміст Hb A <sub>1c</sub> , %
Контроль	26,61 $\pm$ 2,11	4,53 $\pm$ 0,05
Діабет	19,20 $\pm$ 1,60*	8,81 $\pm$ 0,41*
Контроль + AG	29,31 $\pm$ 1,38	4,49 $\pm$ 0,07
Діабет + AG	23,31 $\pm$ 1,08**	6,03 $\pm$ 0,28**

\* - різниця вірогідна порівняно з контролем,  $p < 0,05$

\*\* - різниця вірогідна порівняно із діабетом,  $p < 0,05$

5 Оксидативний стрес за умов цукрового діабету є наслідком підвищення концентрації продуктів перекисного окиснення ліпідів, окислених ліпопротеїнів низької густини та похідних арахідонової кислоти. Посилення інтенсивності процесів глікозилювання супроводжується збільшенням вмісту продуктів кінцевого глікозилювання - AGEs (advanced glycation end products). AGEs утворюються в організмі хворого на діабет досить швидко - протягом кількох

10 місяців, після чого навіть найретельніша компенсація метаболічних порушень вже нездатна ліквідувати присутність цих речовин. Кінцеві продукти глікозилювання індують експресію генів багатьох білків, що мають проатерогенні властивості (ламінін B<sub>1</sub>, трансформуючий фактор росту  $\beta 1$ , колаген IV типу та ін.) (Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., 2000).

За умов цукрового діабету 1-го типу у еритроцитах значно зростає активність індукцйбельної

15 NO - синтази, яка продукує величезні кількості оксиду азоту та супероксиданіон-радикалу (табл. 2). NO у високих концентраціях не реалізує свій фізіологічний регуляторний ефект через гуанілатциклазу, а, навпаки, здійснює пряму цитотоксичну та імуногенну дію, взаємодіючи із O<sub>2</sub><sup>-</sup> і утворюючи пероксинітрит, котрий індукуює пошкодження DNA та інгібує функції багатьох ферментів. Характер рівноваги перекисне окиснення ліпідів - антиоксидантна система, який

20 відображає рівень ендогенної інтоксикації в організмі, значною мірою узалежнений від рівня продукції NO.

На наступному етапі досліджень аналізують зміни у супероксиддисмутазній, каталазній, глутатіонпероксидазній активностях еритроцитів та зміни вмісту ТБК-позитивних продуктів у плазмі за норми та за експериментального цукрового діабету на фоні впливу аміногуанідину.

25 Отримані результати представлені у табл. 2.

Табл. 2.

Активність ферментів антиоксидантної системи та вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у щурів ( $M \pm m$ ,  $n=14$ )

Показники	Контроль (К)	Діабет (Д)	К + AG	Д + AG
СОД, ум.од. на 1 мл крові	0,91 $\pm$ 0,01	0,76 $\pm$ 0,05*	1,05 $\pm$ 0,01*	0,99 $\pm$ 0,02*
Каталаза, нмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> на 1 мг Hb за 1 хв (еритроцити)	215,74 $\pm$ 4,83	197,88 $\pm$ 3,2 <sub>3*</sub>	333,78 $\pm$ 5,3 <sub>4*</sub>	311,96 $\pm$ 6, <sub>24**</sub>
ГПО, мкмоль GSH на 1 г Hb за 1 хв (еритроцити)	700,23 $\pm$ 11,4 <sub>8</sub>	665,57 $\pm$ 7,3 <sub>3*</sub>	678,99 $\pm$ 6,0 <sub>2*</sub>	608,32 $\pm$ 5, <sub>64*</sub>
NOS, пмоль NADPH/x в на 1 мг білка	0,831 $\pm$ 0,028	1,288 $\pm$ 0,10 <sub>1*</sub>	0,673 $\pm$ 0,05 <sub>1*</sub>	0,450 $\pm$ 0,0 <sub>39**</sub>
ТБК-позитивні продукти, нмоль на 1 мл плазми	67,66 $\pm$ 8,50	124,29 $\pm$ 11, <sub>7*</sub>	69,42 $\pm$ 3,07	102,46 $\pm$ 2, <sub>45**</sub>

\* - різниця вірогідна порівняно з контролем,  $p < 0,05$

\*\* - різниця вірогідна порівняно з діабетом,  $p < 0,05$

Активність супероксиддисмутази при діабеті знижується, що може бути пов'язане із впливом AGEs та ONOO<sup>-</sup>. Введення аміногуанідину мало за умов цукрового діабету, нормалізуючий

вплив, тобто значення активності супероксиддисмутази було порівняльним до величини цього показника у нормі (табл. 2).

Каталаза реагувала на запропоновані модельні ситуації так само. Глутатіонпероксидаза - фермент, який виявив найменші амплітуди відповіді, але слід зазначити, що навіть незначне інгібування глутатіонпероксидази за фізіологічних умов спричиняє зростання токсичних ефектів та підвищення концентрації активних форм кисню.

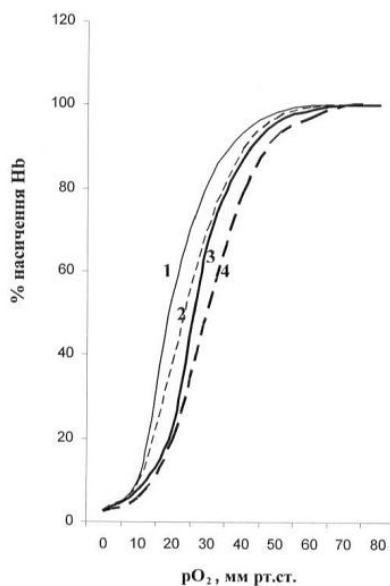
Зростання на 83 % вмісту ТБК-позитивних продуктів за умов цукрового діабету порівняно з контролем у еритроцитах (табл.2), є наслідком збільшення вмісту активних форм кисню за умов інтенсифікації окислювальних процесів у клітинах крові за умов діабету.

Вплив аміногуанідину мав різноспрямовану дію за норми та за патології. За норми активність ферментів на фоні введення досліджуваної речовини зростала, а за умов стрептозотоцинового діабету наближалась до норми (табл. 2).

Для послаблення токсичної дії NO і корекції патологічного стану, пов'язаного з його гіперпродукцією в організмі за умов цукрового діабету 1-го типу, доцільним є використання аміногуанідину як селективного інгібітору індукцибельної NO-синтази, інгібітору неферментативного глікозилювання, антиоксиданта, а також чинника, здатного попереджати посттрансляційні модифікації білків за участі пероксинітриту. Застосування аміногуанідину є однією із ланок у перспективному створенні препаратів для комплексної терапії, які допоможуть запобігти розвитку діабетичних ускладнень.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб профілактики цукрового діабету та його ускладнень, що містить введення селективного інгібітору індукцибельної NO-синтази і неферментативного глікозилювання, який **відрізняється** тим, що як інгібітор використовують водний розчин аміногуанідину, який вводять per os 1г на 1л води цілодобово упродовж 3-4 тижнів діабетичним щурам.




---

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601