

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.379-003.64-092-074

© Коллектив авторов

### ВЛИЯНИЕ МИЛДРОНАТА НА РАЗВИТИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕВРОПАТИИ И НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОБМЕНА ГЛЮКОЗЫ И ЛИПИДОВ У КРЫС СО СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОЙ МОДЕЛЬЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА

*Е. Соколовска<sup>1\*</sup>, Ю. Румахс<sup>2</sup>, Н. Караева<sup>2</sup>, Д. Гринвалде<sup>2</sup>, Е. Шапирова<sup>1</sup>,  
В. Клуша<sup>2</sup>, И. Калвиньш<sup>1</sup>, Н. Сьякте<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Латвийский Институт органического синтеза, Рига, LV-1006, ул. Айзкрауклес, 21, Латвия; тел.: +371 67038266; факс: +371 67550338; эл. почта: lizsjak@yahoo.com

<sup>2</sup>Медицинский факультет Латвийского Университета, Рига, LV-1001, ул. Шарлотес 1а, Латвия

Крысам со стрептозотоциновой моделью сахарного диабета перорально или внутривентриально вводили милдронат (100 мг/кг ежедневно) в течение 6 недель. Вес животных, развитие невропатических болей, концентрацию глюкозы, триглицеридов и кетоновых тел в крови, процент гликированного гемоглобина, тест толерантности глюкозы определяли в течение всего эксперимента. Милдронат полностью предотвращал развитие диабетической невропатии, с первой недели и до конца эксперимента. В группе животных, получавших милдронат, наблюдали значимое снижение среднего уровня глюкозы на четвертой неделе курса, триглицеридов с третьей по шестую недели. Милдронат также замедлял накопление гликированного гемоглобина на шестой неделе и улучшал показатели теста толерантности глюкозы по сравнению с нелечеными животными. Полученные данные подтверждают возможность применения препарата для лечения сахарного диабета и его осложнений.

**Ключевые слова:** милдронат, стрептозотцин, сахарный диабет, периферическая невропатия.

**ВВЕДЕНИЕ.** Сахарный диабет и его осложнения остаются острой медицинской и социальной проблемой в развитых странах. Диабетическая невропатия является одним из самых тяжелых осложнений сахарного диабета [1-3]. В настоящее время для лечения невропатической боли при диабете наиболее часто применяются трициклические антидепрессанты (имипрамин, amitriptilin), противоэпилептические средства из класса блокаторов натриевых каналов (карбамазепин, окскарбазепин) и лиганды  $\alpha 2\delta$ -субъединицы потенциал-зависимых каналов ЦНС (габапентин, прегабалин). Однако, применение всех этих препаратов ограничивается их слабой эффективностью и побочными эффектами [2,3]. Это побуждает к поиску новых средств для лечения осложнений диабета.

Ингибиторы бета-окисления жирных кислот считаются перспективными противодиабетическими средствами, поскольку они способствуют потреблению глюкозы [4]. Представитель данной группы препаратов милдронат широко применяется как противоишемическое средство. Этот фармакологический эффект милдроната достигается путем ингибирования гамма-бутиробетаингидроксилазы и снижения бета-окисления жирных кислот [5]. В клинике милдронат оказался эффективным для лечения некоторых осложнений инсулин-независимого сахарного диабета [6-9]. В экспериментальных исследованиях милдронат

\* - адресат для переписки

оказывал влияние на потребление глюкозы и метаболизм кетоновых тел, стимулировал инсулин-зависимое потребление глюкозы [10–12]. Показано также, что милдронат ускоряет окисление глюкозы в сердцах крыс при гипоксии [13]. Препарат защищает и от токсического действия других соединений. В изолированных митохондриях сердца крысы милдронат предотвращал повреждение митохондриального комплекса I азидотимидином, - препаратом, используемым против ВИЧ [14]. При моделировании кардиотоксического действия азидотимидина на мышцах милдронат оказывал противовоспалительное действие, снижая клеточную инфильтрацию и экспрессию транскрипционного фактора NF-κBp65 в ядрах кардиомиоцитов [15]. Милдронат снижал также кардиотоксичное действие других анти-ВИЧ препаратов – ламивудина и ставудина [16]. В настоящее время гипергликемия считается основной причиной повреждения клеток приводящего к диабетической невропатии [1]. Однако и другие факторы, такие как усиленная выработка свободных радикалов в митохондриях, снижение уровня окиси азота и глутатиона могут усилить осмотическое давление на клеточную мембрану и снизить антиоксидантную защиту. Учитывая способность милдроната защищать митохондрии от повреждений [14], можно предположить, что препарат будет предотвращать развитие невропатии. Анализ выше приведенных данных побудил к дальнейшим исследованиям, направленным на расширение использования милдроната как возможного сопутствующего средства для лечения сахарного диабета и его осложнений. Мы провели исследование по влиянию милдроната на развитие периферической невропатии, а также на некоторые показатели обмена глюкозы и липидов, у крыс со стрептозотоциновой моделью сахарного диабета.

#### **МЕТОДИКА.**

*Реактивы.* Милдронат [3-(2,2,2-триметилгидразин) пропионат] был любезно предоставлен компанией “Гриндекс” (г. Рига, Латвия) в виде гигроскопичного белого кристаллического порошка с легким запахом, с содержанием примесей не выше 0,03%. Стрептозотцин был приобретён у “Sigma-Aldrich Chemie GmbH” (г. Тауфкирхен, Германия), безводная глюкоза - у “Chempur” (г. Карлсруе, Германия).

*Животные.* Самцы крыс линии Вистар весом 180-210 г получены из Лаборатории экспериментальных животных Рижского Университета им. П. Страдыня (г. Рига, Латвия). Животных адаптировали к условиям эксперимента за неделю до его начала. В течение эксперимента животных содержали при 22±2°C, искусственном освещении с 12-часовым циклом света и темноты, свободном доступе к воде и корму.

*Этика.* Все экспериментальные процедуры произведены в согласии с указаниями директивы 86/609/ЕЕС “Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и для других научных целей” (1986) и были одобрены Комитетом по этике животных Пищевой и ветеринарной службы (г. Рига, Латвия).

*Постановка экспериментов.* Проведены две серии экспериментов: исследования невропатических болей (группы 1–4) и метаболических показателей (группы 5–8).

Группа 1 (n = 8). Контроль для исследования невропатических болей. Крысам делали по две инъекции физиологического раствора в течение двух дней, а потом – по одной инъекции в течение шести недель.

Группа 2 (n = 8). Животных этой группы использовали для исследования невропатических эффектов стрептозотоцинового диабета. Разведённый в физиологическом растворе стрептозотцин вводили внутривентрально, в дозе 60 мг/кг в течение двух дней (общая доза 120 мг/кг). Этот режим введения был несколько модифицирован по сравнению с ранее опубликованным [17] и выбран как наиболее подходящий. День введения стрептозотцина считался первым днём эксперимента, а показатели этого дня принимались за исходные. Крысам вводили физиологический раствор в течение последующих шести недель.

Группа 3 (n = 8). Для исследования воздействия милдроната на невропатию крысам делали внутрибрюшинные инъекции физиологического раствора в течение двух дней, за которыми следовали инъекции милдроната (100 мг/кг) в течение шести недель.

Группа 4 (n = 8). Животных этой группы использовали для исследования воздействия милдроната на невропатию у крыс со стрептозотоциновым диабетом. Стрептозотоциновый диабет вызывали как в группе 2. Раствор милдроната в физиологическом растворе (100 мг/кг) вводили внутрибрюшинно в течение шести недель, начиная со дня первой инъекции стрептозотоцина.

Группа 5 (n = 12) служила контролем для изучения метаболических показателей. Животным вводили 0,2 мл физиологического раствора в хвостовую вену.

Группа 6 (n = 12), использовалась для исследования метаболических эффектов милдроната как такового. Крысы перорально получали раствор милдроната, 100 мг/кг ежедневно.

Группа 7 (n = 15) использована для исследования нарушений метаболизма, вызванных стрептозотоциновым диабетом. Стрептозотоциновый диабет вызывали однократным введением через хвостовую вену свежеприготовленного раствора стрептозотоцина в дозе 50 мг/кг в 10 мМ цитратном буфере (pH 4,5), объём инъекции составлял 0,2-0,25 мл. Развитие диабета через 120 часов подтверждали, определяя уровень глюкозы на сытый желудок. Для дальнейших экспериментов отбирали крыс с уровнем глюкозы выше 13,89 мМ (250 мг %). В качестве альтернативы лечению милдронатом животные получали 0,5 мл воды перорально. Моделируемый введением стрептозотоцина сахарный диабет в наших опытах характеризовался всеми специфическими симптомами: полиурией, полидипсией, снижением веса и выраженной стабильной гипергликемией (>20 мМ у сытых животных). При этом смертность животных была небольшой, а диабетический синдром – стабильным, что совпадает с данными литературы [18].

Группа 8 (n = 12) сформирована из животных со стрептозотоциновым диабетом (как в группе 8), которых лечили милдронатом (100 мг/кг перорально). Лечение начинали через 5 дней после индукции диабета (нулевая неделя).

*Определение болевого порога.* Болевой порог определяли при помощи альгезиметра (Ugo Basile Model.17181, Италия). В течение трёх дней до эксперимента измеряли реакцию (отдергивание лапки) в ответ на механическое давление (в граммах). Среднее значение трёх измерений принимали за исходный уровень. Далее болевой порог определяли еженедельно.

*Определение метаболических показателей.* Образцы крови получали пункцией хвостовой вены. Перед лечением (нулевая неделя) и в конце каждой недели курса лечения (1-ая, 2-ая, 3-я, 4-ая, 5-ая, 6-ая недели) у сытых крыс исследовали следующие показатели: вес, уровень глюкозы в крови, концентрацию кетоновых тел и триглицеридов в крови, а также общий холестерин в крови. Уровень гликированного гемоглобина (HbA<sub>1c</sub>%) определяли на нулевой, 2-ой, 4-ой и 6-ой неделях. Тест на толерантность к глюкозе проводили на 4-ой и 6-ой неделях. Глюкозу и кетоновые тела определяли при помощи портативного глюкометра MediSense OptiumXceed (“Abbott”, Diagnostics Abbott Laboratories Baltics SIA, г. Рига, Латвия), а концентрацию триглицеридов – аппаратом Accutrend GCT (“Roche”, Roche Latvia SIA, г. Рига, Латвия). Уровень гликированного гемоглобина (HbA<sub>1c</sub>%) определяли аппаратом Nycocard Reader (“Axis-Shield”, г. Лондон, Великобритания). Для проведения орального теста на толерантность глюкозы крысам не давали корм в течение ночи, сохраняя свободный доступ к воде, утром животных взвешивали и определяли глюкозу в крови (0 мин). Затем животные получали водный раствор декстрозы через рот (2 г/кг). Впоследствии уровень глюкозы в крови определяли через 15, 30, 60 и 120 минут после введения декстрозы.

*Статистика.* Статистические расчёты проводили при помощи программы GraphPad Prism 4. Достоверность рассчитывали по ANOVA с последующей коррекцией

## ВЛИЯНИЕ МИЛДРОНАТА НА ОСЛОЖНЕНИЯ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДИАБЕТА

по Бонферрони (различия с  $p < 0,05$  считались статистически достоверными). Все данные представлены в виде средних  $\pm$  среднеквадратическое отклонение.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** В настоящем исследовании мы проверили эффекты длительного лечения милдронатом, вводимым перорально или внутривбрюшинно в дозе 100 мг/кг в течение шести недель крысам со стрептозотоциновым диабетом на развитие невропатических болей, а также на некоторые показатели обмена глюкозы и липидов. Длительность курса (6 недель) определяли три обстоятельства. Во-первых, для развития метаболических эффектов милдроната нужно не менее двух недель [5]. Во-вторых, шесть недель считаются достаточными для определения влияния любого препарата на  $HbA_{1c}\%$  [19, 20]. В третьих, ожидается, что любое потенциальное противодиабетическое средство будет применяться длительно, поэтому курс от четырех до шести недель, с одной стороны, будет максимально коротким, а с другой - достаточно долгим для предварительной оценки эффектов длительного лечения в модели на животных. Мы остановились на ежедневной дозе милдроната в 100 мг/кг, поскольку именно эта доза оказалась наиболее эффективной в ранее проведенных исследованиях [5, 15, 21]

*Влияние милдроната на порог невропатической боли.* Как видно на рисунке 1, стрептозототин вызывал значительное снижение болевого порога примерно на 20% сразу после его первого введения. Это снижение становилось более выраженным, начиная со второй недели (на 20-30%) и сохранялось в течение всего эксперимента. Милдронат в дозе 100 мг/кг полностью предотвращал этот эффект стрептозототина, начиная с первой недели и до конца эксперимента. У контрольных животных милдронат не изменял болевой порог.

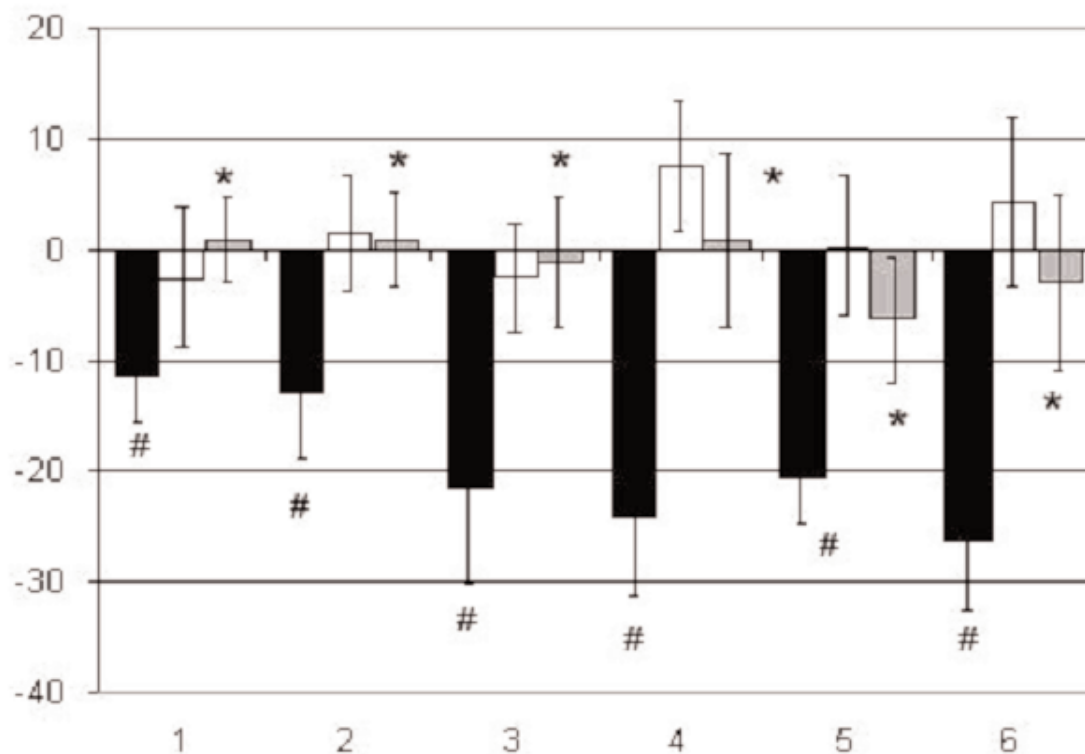


Рисунок 1.

Влияние милдроната на развитие вызванной стрептозототином невропатии у крыс. Милдронат вводили внутривбрюшинно в течение 6 недель в дозе 100 мг/кг. # -  $p < 0,05$  по отношению к контролю (физиологический раствор, группа 1) \* $p < 0,05$  по отношению к группе стрептозототинового диабета (группа 2). По оси абсцисс - время (недели), ось ординат - изменения болевого порога, %. Чёрные столбики - стрептозототин (группа 2); белые столбики - милдронат (группа 3); серые столбики - стрептозототин + милдронат (группа 4).

*Исследование параметров метаболизма.* Чтобы выяснить механизм противоболевого действия препарата, было исследовано влияние милдроната на уровень глюкозы и гликированного гемоглобина, поскольку гипергликемия и гликирование белков считаются основными факторами риска диабетической невропатии [1], а также некоторые другие показатели обмена глюкозы и липидов. Результаты измерений веса животных в ходе эксперимента приведены в таблице 1. Вследствие развития диабета крысы не прибавляли в весе в течение всего эксперимента. Начиная с 1-ой недели, вес животных в группах нелеченного стрептозотоцинового диабета и получавших милдронат после развития диабета был значительно ниже, чем у контрольных крыс. Милдронат не влиял на динамику изменения веса ни здоровых, ни диабетических крыс.

Таблица 1. Средний вес крыс в экспериментальных группах (г) во время курса милдроната. Неделя 0 - неделя перед началом лечения. Недели 1-6 - номер недели после начала лечения милдронатом.

Группы	Средний вес (г)						
	Неделя 0	Неделя 1	Неделя 2	Неделя 3	Неделя 4	Неделя 5	Неделя 6
<b>Контроль</b> (группа 4)	205,00±1,89	246,15±5,61	267,69±6,52	278,46±8,39	295,83±9,96	295,38±9,24	314,38±9,13
<b>Милдронат</b> (группа 5)	215,00±2,67	241,54±5,76	262,31±7,86	271,54±8,39	281,36±6,25	274,17±7,63	289,38±8,73
<b>STZ</b> (группа 7)	207,50±2,5	211,18±6,12*	202,94±7,16*	201,43±9,43*	198,75±6,79*	191,67±7,37*	205,63±9,13*
<b>STZ + милдронат</b> (группа 8)	195,71±2,02	221,00±4,64*	217,50±4,64*	206,47±5,00*	206,00±6,08*	194,12±5,29*	207,50±8,68*

Примечание: Здесь и в таблицах 2-5 STZ - стрептозотозин, \* -  $p < 0,05$  по отношению к контрольной группе, \*\* -  $p < 0,05$  по отношению к стрептозотозиновогой группе.

*Влияние милдроната на концентрацию глюкозы в крови.* Результаты приведены в таблице 2. У диабетических крыс мы наблюдали продолжительное увеличение уровня глюкозы. Средняя концентрация глюкозы достигала максимума на 4-ой неделе и слегка снижалась на 5-ой и 6-ой неделях. В группе крыс, получавших милдронат после развития диабета, самый высокий уровень глюкозы наблюдали на 3-ей неделе. В этой группе наблюдалась тенденция к снижению глюкозы с 3-ей по 6-ую неделю, а на 4-ой неделе снижение уровня глюкозы по сравнению группой нелеченного стрептозотозинового диабета было статистически значимым (таблица 2). Наши результаты о влиянии милдроната на метаболизм глюкозы согласуются с данными литературы. Известно, например, что у интактных мышей и у крыс Гото-Кокизаки милдронат в дозе 200 мг/кг значительно снижал уровень глюкозы после трёхнедельного курса [11, 12].

## ВЛИЯНИЕ МИЛДРОНАТА НА ОСЛОЖНЕНИЯ СРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДИАБЕТА

Таблица 2. Влияние милдроната на концентрацию глюкозы в крови (ммМ) в ходе шестинедельного курса милдроната. Неделя 0 - неделя перед началом лечения. Недели 1 - 6 - номер недели после начала лечения милдронатом.

Группы	Концентрация глюкозы в крови (ммМ)						
	Неделя 0	Неделя 1	Неделя 2	Неделя 3	Неделя 4	Неделя 5	Неделя 6
Контроль (группа 5)	6,31±0,49	5,61±0,24	5,98±0,23	5,62±0,23	5,13±0,21	4,82±0,18	4,99±0,22
Милдронат (группа 6)	6,08±0,38	5,46±0,26	5,55±0,36	5,42±0,30	5,30±0,23	4,63±0,19	4,94±0,17
STZ (группа 7)	25,25±1,11*	23,87±0,79*	28,82±2,49*	29,71±2,31*	40,27±3,34*	32,34±2,89*	32,11±4,13*
STZ + милдронат (группа 8)	25,24±1,31*	23,38±0,63*	32,31±2,53*	34,88±3,28*	29,82±2,12***	28,65±2,00*	27,32±2,92*

Динамика гликированного гемоглобина во время лечения милдронатом. Уже через 5 дней после введения стрептозотоцина у нелеченных и леченных крыс со стрептозотоциновым диабетом отмечено значительное возрастание содержания HbA<sub>1c</sub>%. У нелеченных крыс уровень HbA<sub>1c</sub>% быстро возрастал и достигал максимума на 6-ой неделе. Лечение милдронатом замедляло нарастание уровня HbA<sub>1c</sub>%, его содержание увеличивалось до 4-ой недели, потом оставалось постоянным, а на 6-ой неделе различие в содержании HbA<sub>1c</sub>% между группами леченных и нелеченных животных было статистически значимым (табл. 3). Динамика HbA<sub>1c</sub>% во время эксперимента подтверждает позитивный эффект препарата на уровень глюкозы у диабетических животных. Уровень HbA<sub>1c</sub>% отражает концентрацию глюкозы в течение долгого времени (месяц и более). Поскольку уровень глюкозы может зависеть от многих факторов (инфекция, стресс, особенности диеты, физическая активность) HbA<sub>1c</sub>% является более информативным показателем долгосрочной компенсации диабета [22]. Благоприятное воздействие милдроната на этот показатель впервые обнаружено в нашем исследовании.

Таблица 3. Влияние милдроната на процентное содержание гликированного гемоглобина в ходе шестинедельного курса милдроната. Неделя 0 - неделя перед началом лечения. Неделя 2, 4, 6 - номер недели после начала лечения милдронатом.

Группы	HbA <sub>1c</sub> %			
	Неделя 0	Неделя 2	Неделя 4	Неделя 6
Контроль (группа 5)	3,40±0,18	3,97±0,69	3,58±0,10	3,43±0,13
Милдронат (группа 6)	3,20±0,06	3,29±0,12	3,37±0,06	3,67±0,12
STZ (группа 7)	4,76±0,40*	6,10±0,34*	8,44±0,18*	9,66±0,21*
STZ + милдронат (группа 8)	4,53±0,14*	6,70±0,27*	8,79±0,29*	8,75±0,33***

*Тест на толерантность к глюкозе.* Тесты проводили на 4-ой и 6-ой неделях. Наблюдались различия в форме кривых между диабетическими и здоровыми крысами. У здоровых крыс максимальный подъем концентрации глюкозы наблюдался на 60-ой минуте после дачи декстрозы, а у диабетических крыс максимум достигался уже через 30 минут. На 4-ой неделе сахарные кривые у крыс, получавших милдронат, отражали лучшую переносимость глюкозы (через 120 минут уровень глюкозы снижался до  $14,17 \pm 1,13$  мМ, у диабетических крыс – только до  $17,79 \pm 1,29$  мМ (рис. 2А). Однако эти различия нивелировались на 6-ой неделе (рис. 2Б).

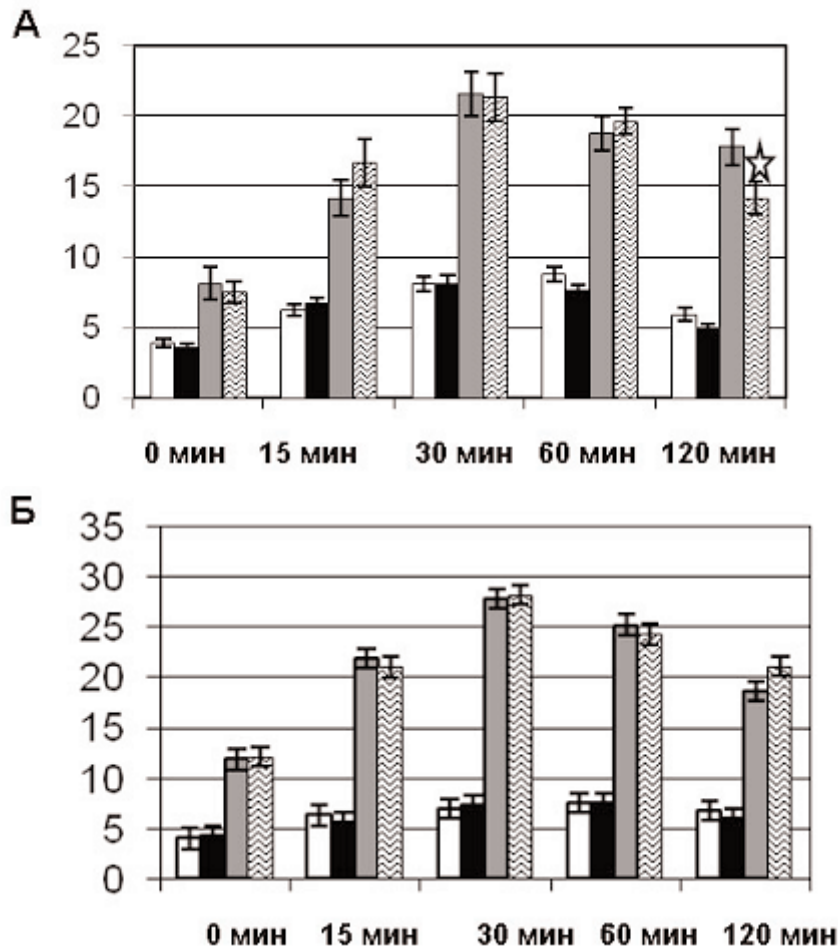


Рисунок 2.

Средние значения уровня глюкозы сахарной кривой через 4 недели (А) и 6 недель лечения милдронатом (Б). Ось абсцисс - минуты после принятия декстрозы, ось ординат - средние значения уровня глюкозы. Белые столбики - контроль (группа 5); чёрные столбики - милдронат (группа 6); серые столбики - стрептозотоциновый диабет (группа 7); заштрихованные столбики - стрептозотоциновый диабет + милдронат (группа 8). Звёздочка обозначает статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) по отношению к группе 7 (стептозотоциновый диабет).

*Влияние милдроната на липидный обмен.* На нулевой и 1-ой неделе мы не наблюдали значительных различий в уровне триглицеридов между группами (табл. 4). На 2-ой и 3-ей неделях концентрация триглицеридов в стрептозотоциновой группе была значительно ниже, чем в контрольной. С 4-ой по 6-ую неделю уровень триглицеридов у диабетических животных, получавших милдронат, был ниже,

## ВЛИЯНИЕ МИЛДРОНАТА НА ОСЛОЖНЕНИЯ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДИАБЕТА

чем у нелеченных крыс. Кроме того, у здоровых крыс, получавших милдронат, уровень триглицеридов был ниже, чем в контрольной группе. Уровень холестерина определяли только в предварительном исследовании, поскольку милдронат не влиял на уровень холестерина, исследование не было продолжено (не показано).

Таблица 4. Влияние милдроната на концентрацию триглицеридов в крови (мМ) в ходе шестинедельного курса милдроната. Неделя 0 - неделя перед началом лечения. Неделя 1-6 - номер недели после начала лечения милдронатом.

	Концентрация триглицеридов в крови (мМ)						
Группы	Неделя 0	Неделя 1	Неделя 2	Неделя 3	Неделя 4	Неделя 5	Неделя 6
Контроль (группа 5)	1,57±0,17	1,67±0,12	1,59±0,10	1,83±0,14	2,14±0,17	1,83±0,10	1,54±0,11
Милдронат (группа 6)	1,49±0,10	1,50±0,12	1,51±0,13	1,69±0,18	1,70±0,10*	1,45±0,11*	1,46±0,11
STZ (группа 7)	1,89±0,73	1,69±0,20	1,19±0,07*	1,38±0,11*	1,91±0,26	1,23±0,08*	1,77±0,30
STZ + милдронат (группа 8)	1,57±0,25	2,11±0,29	1,47±0,16	1,28±0,10*	1,29±0,10***	1,04±0,03***	1,12±0,09***

Влияние милдроната на концентрацию кетоновых тел. Мы не обнаружили значительных изменений в уровне кетоновых тел у диабетических крыс в течение всего эксперимента, только на нулевой неделе отмечалось небольшое увеличение кетоновых тел у диабетических животных по сравнению с контрольными (табл. 5).

Таблица 5. Влияние милдроната на концентрацию кетоновых тел в крови (мМ) в ходе шестинедельного курса милдроната. Неделя 0 - неделя перед началом лечения. Неделя 1 - 6 - номер недели после начала лечения милдронатом.

	Концентрация кетоновых тел в крови (мМ)						
Группы	Неделя 0	Неделя 1	Неделя 2	Неделя 3	Неделя 4	Неделя 5	Неделя 6
Контроль (группа 5)	0,46±0,08	0,48±0,04	0,44±0,07	0,42±0,04	0,55±0,04	0,46±0,05	0,46±0,05
Милдронат (группа 6)	0,46±0,06	0,42±0,03	0,53±0,10	0,49±0,03	0,47±0,03	0,37±0,04	0,52±0,06
STZ (группа 7)	1,16±0,54	0,54±0,07	0,41±0,03	0,42±0,03	0,57±0,05	0,43±0,04	0,59±0,08
STZ + милдронат (группа 8)	0,64±0,12	0,53±0,04	0,50±0,06	0,48±0,05	0,58±0,05	0,41±0,03	0,59±0,11

*Возможные механизмы гипогликемического действия милдроната.* Основным воздействием милдроната на метаболизм считается ингибирование бета-окисления жирных кислот, что способствует потреблению глюкозы [5, 13, 21]. Схема на рисунке 3 поясняет этот механизм. Недавно показано, что милдронат стимулирует инсулин-зависимое потребление глюкозы в изолированных сердцах мыши и повышает экспрессию некоторых генов и ферментов, вовлечённых в метаболизм глюкозы [11], кроме того, препарат снижал уровень глюкозы у крыс Гото-Кокизаки [12], используемых в качестве модели инсулин-независимого диабета. Таким образом, милдронат потенцирует действие инсулина.

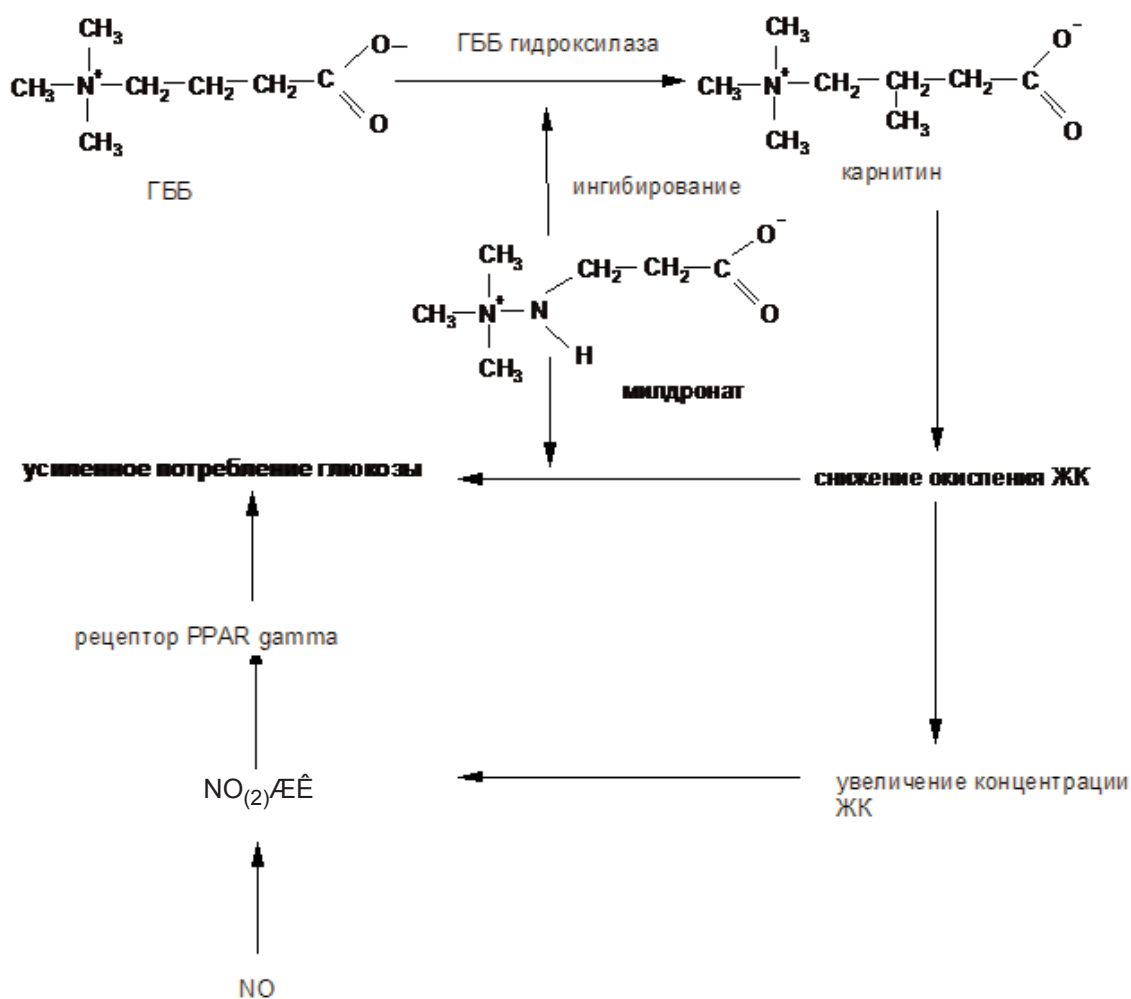


Рисунок 3.

Гипотетический механизм гипогликемического действия милдроната. ГББ - гамма-бутиробетанин; ЖК - свободные жирные кислоты; NO<sub>(2)</sub>ЖК - нитрозилированные жирные кислоты.

Как же объяснить гипогликемическое действие препарата при стрептозотоциновом диабете, для которого характерна тяжелая недостаточность инсулина? Поскольку при стрептозотоциновом диабете основная масса бета-клеток гибнет, а инсулин синтезируется в немногих выживших клетках, возможно, благоприятным оказывается способность милдроната способствовать клеточной пролиферации [5]. Достижения последних лет в исследовании роли оксида азота и его производных позволяют по-иному трактовать механизм действия милдроната на диабетических животных. Оксид азота и окисленные липиды в настоящее время считаются взаимозависимыми регуляторами метаболического гомеостаза [23].

Показано, что нитрозилированные жирные кислоты являются эндогенными лигандами для активизируемого пролифератором пероксисом рецептора гамма (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR). Этот ядерный гормональный рецептор регулирует гомеостаз глюкозы и метаболизм липидов [23]. Данное обстоятельство позволяет предложить ещё один гипотетический механизм гипогликемического действия милдроната. Показано, что у диабетических животных усиливается продукция окиси азота в кровеносных сосудах [24]. Сам по себе милдронат тоже вызывает, хотя незначительное и преходящее, но воспроизводимое в экспериментах усиление биосинтеза окиси азота [25]. Увеличение концентрации циркулирующих жирных кислот в результате торможения их бета-окисления, с одной стороны, и усиленная продукция оксида азота, обусловленная как диабетом, так и действием милдроната, с другой стороны, должны усилить синтез нитро-производных жирных кислот. Связывание последних с PPAR-рецептором может привести к снижению уровня глюкозы (рис. 3).

*Механизм снижения болевого порога милдронатом остается неясным.* Хотя гипергликемия считается основным фактором риска диабетической невропатии [1], снижение болевого порога нельзя объяснить гипогликемическим эффектом препарата, поскольку последний был достигнут только на 4-ой неделе курса, а снижение болевого порога – уже в самом начале курса. Снижение гликирования гемоглобина и, возможно, других белков тоже могло бы предотвращать развитие невропатии, но и этот эффект развивался только на шестой неделе лечения. Остается предположить, что милдронат может взаимодействовать со многими внутриклеточными медиаторами воспаления, например с оксидом азота [25] и фактором NF-κB [15]. Кроме того, препарат может влиять на процессы митохондриального дыхания [14] и таким образом снижать болевой порог.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** Наши данные указывают на применимость милдроната для предотвращения или лечения диабетических больных с невропатическими болями благодаря его быстрому действию и также ранее отмеченной малой токсичности [5]. Наши результаты свидетельствуют о том, что милдронат, оказывающий положительное воздействие на углеводный и липидный обмен и облегчающий невропатические боли является перспективным противодиабетическим средством.

Работа финансировалась из средств Государственной программы исследований по медицине Латвийской Республики 10-4/VPP “Разработка новых средств и методов профилактики, лечения и диагностики, разработка биомедицинских технологий для укрепления общественного здоровья”, проект №3 “Исследование осложнений диабета и биологическая активность сердечно-сосудистых препаратов” и из гранта № 04.1317 Латвийского Совета по науке.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Tomlinson D.R., Gardiner N.J. (2008) Nat. Rev. Neurosci., **9**, 36–45.
2. Cruccu G. (2007) Curr. Opin. Neurol., **20**, 531-535.
3. Ziegler D. (2008) Diabetes Metab. Res. Rev., **Suppl. 1**, S52- S57.
4. Vitale C., Collin P. (2008) Curr. Pharm. Des., **14**, 2537-2550.
5. Sjakste N., Kalvins I. (2006) Pharmacologyonline, **1**, 1-18
6. Ботабекова Т.К., Имантаева М.В., Жазини Б.С., Джуматаева З.А. (2004) Медицина, **2**, 69-71.
7. Стаценко М.Е., Полетаева Л.В., Туркина С.В., Анухтин А.Ф., Дудченко Г.П. (2008) Тер. Арх., **80**(10), 27-30.
8. Стаценко М.Е., Полетаева Л.В., Туркина С.В., Иноземцева М.А., Анухтин А.Ф. (2008) Клин. мед., **86**(9), 67-71.
9. Суслина З.А., Максимова М.Я., Кистенев Б.А., Федорова Т.Н., Ким Е.К. (2005) Фарматека, **12**, 68-71.

10. Симхович Б.З., Мецрена Д.В., Хаги Х.Б., Шутенко Ж.В., Молодчина Т.Н., Калвинш И.Я., Лукевич Э.Я. (1991) Фармакол. токсикол., **54**, 41-42.
11. Liepins E., Vilskerts R., Skapare E., Svalbe B., Kuka J., Cirule H., Pugovics O., Kalvins I., Dambrova M. (2008) Life Sci., **83**, 613-619.
12. Liepinsh E., Vilskersts R., Zvejniece L., Svalbe B., Skapare E., Kuka J., Cirule H., Grinberga S., Kalvinsh I., Dambrova M. (2009) Br. J. Pharmacol., **157**, 1549-1556.
13. Asaka N., Muranaka Y., Kirimoto T., Miyake H. (1998) Fundam. Clin. Pharmacol., **12**, 158-163.
14. Pupure J., Fernandes M.A., Santos M.S., Moreno A.J., Kalvinsh I., Klusa V., Oliveira C.R. (2008) Cell Biochem Funct., **26**, 620-631.
15. Klusa V., Pupure J., Isajevs S., Rumaks J., Gordjushina V., Kratovska A., Taivans I., Svirskis S., Viksna L., Kalvinsh I. (2006) Basic Clin. Pharmacol. Toxicol., **99**, 323-328.
16. Isajevs S., Pupure J., Gordjushina V., Kratovska A., Taivans I., Viksna L., Kalviņš I., Kluša V. (2007) Proc. Latvian Acad. Sci. Part B, **6**, 26-32.
17. Runge-Morris M., Vento C. (1995) Drug Metabol. Dispos., **23**, 455-459.
18. McNeill J.H. (1999) Experimental models of diabetes. CRC Press LLC.
19. Pari L., Satheesh M.A. (2006) Life Sci., **79**, 641-645.
20. Chandramohan G., Ignacimuthu S., Pugalendi K.V. (2008) Eur. J. Pharmacol., **590**, 437-443.
21. Dambrova M., Liepinsh E., Kalvinsh I. (2002) Trends Cardiovasc. Med., **12**, 275-279.
22. Qaseem A., Vijan S., Snow V., J. Cross T., Weiss K., Owens D. (2007) Ann. Intern. Med., **147**, 417-422.
23. Schopfer F.J., Lin Y., Baker P.R., Cui T., Garcia-Barrio M., Zhang J., Chen K., Chen Y.E., Freeman B.A. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102**, 2340-2345.
24. Stadler K., Jenei V., Somogyi A., Jakus J. (2005) Diabetes Metab. Res. Rev., **21**, 189-196.
25. Sjakste N., Kleschyov A.L., Boucher J.L., Bauman L., Dzintare M., Meirena D., Sjakste J., Sydow K., Münzel T., Kalvinsh I. (2004) Eur. J. Pharmacol., **495**, 67-73.

Поступила: 21. 10. 2010.

# THE INFLUENCE OF MILDRONATE ON PERIPHERAL NEUROPATHY AND SOME CHARACTERISTICS OF GLUCOSE AND LIPID METABOLISM IN RAT STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES MELLITUS MODEL

J. Sokolovska<sup>1</sup>, J. Rumaks<sup>2</sup>, N. Karajeva<sup>2</sup>, D. Grīnvalde<sup>2</sup>, J. Sharipova<sup>1</sup>, V. Kluša<sup>2</sup>, I. Kalvinsh<sup>1</sup>, N. Sjakste<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles Street 21, Riga LV1006, Latvia; tel.: +371 67038266; fax: +371 67550338; e-mail: lizsjak@yahoo.com

<sup>2</sup>Faculty of Medicine, University of Latvia, Sharlotes Street 1a, Riga LV1001, Latvia

Streptozotocin (STZ) was used to induce the diabetic rat model. STZ rats were treated with mildronate (100 mg/kg daily, *per os* or intraperitoneally for 6 weeks). Body weight, blood glucose, triglyceride, ketone body concentrations, glycated hemoglobin percent (HbA<sub>1c</sub>%), glucose tolerance, and the development of neuropathic pain were monitored throughout the experiment. In the STZ + mildronate group, mildronate treatment caused a significant decrease in mean blood glucose (on week 4) and triglyceride concentrations (on weeks 3-6), significantly slowed the increase in HbA<sub>1c</sub>% (on week 6) and improved glucose tolerance 120 minutes after glucose ingestion during oral glucose tolerance test versus the STZ group. Mildronate completely protected development of STZ-induced neuropathic pain from the first administration week up to end of the experiment. The obtained data indicate clinical usefulness of the drug for the treatment of diabetes mellitus and its complications.

**Key words:** mildronate, streptozotocin, diabetes mellitus, peripheral neuropathy.