

ВЛИЯНИЕ МЕТФОРМИНА НА АКТИВНОСТЬ  
ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ  
В ТКАНЯХ КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ  
2-ГО ТИПА И МЕТАБОЛИЧЕСКИМ  
СИНДРОМОМ

Кузнецова Л.А., Деркач К.В., Шарова Т.С., Бондарева В.М.,  
Ложков А.А., Шпаков А.О.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова»  
Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

**Контактная информация:**  
Шпаков Александр Олегович  
ФГБНУ «ИЭФБ» РАН  
пр. М. Горького, д. 44, Санкт-Петербург,  
Россия, 194223  
E-mail: alex\_shpakov@list.ru

*Статья поступила в редакцию 02.06.2016  
и принята к печати 09.09.2016.*

**Резюме**

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ) играет важную роль в патогенезе сахарного диабета (СД) 2-го типа и метаболического синдрома (МС), и может рассматриваться как одна из мишеней при их лечении. Однако данные об изменении активности Г6ФДГ при этих заболеваниях немногочисленны. Цель работы состояла в изучении активности Г6ФДГ в мозге, миокарде и эпидидимальном жире (ЭЖ) самцов крыс с СД 2-го типа и МС и влияния на нее длительного лечения антидиабетическим препаратом метформин (МФ). Для индукции СД 2-го типа пятисуточных крысят обрабатывали стрептозотоцином (75 мг/кг). МС у крыс вызывали диетой, включающей потребление 30%-ного раствора глюкозы и насыщенных жиров. Лечение МС и СД 2-го типа проводили в суточной дозе 200 мг/кг в течение 5 или 10 недель. Показано, что в мозге крыс с СД 2-го типа и МС активность Г6ФДГ менялась незначительно. В миокарде и ЭЖ крыс с СД 2-го типа и МС активность Г6ФДГ достоверно повышалась. Лечение животных МФ приводило к ее снижению, причем в миокарде крыс с СД 2-го типа активность фермента достигала ее уровня в контроле. Таким образом, нами показано, что в миокарде и ЭЖ крыс с СД 2-го типа и МС активность Г6ФДГ в значительной степени повышается, а лечение МФ ее нормализует, что является одним из механизмов терапевтического действия МФ.

**Ключевые слова:** глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, метаболический синдром, сахарный диабет 2-го типа, метформин, миокард, эпидидимальный жир.

*Для цитирования:* Трансляционная медицина. 2016; 3 (4): 34–43.

////////////////////////////////////

## THE EFFECT OF METFORMIN ON THE GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN TISSUES OF RATS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND METABOLIC SYNDROME

**Kuznetsova L.A., Derkach K.V., Sharova T.S., Bondareva V.M.,  
Lozhkov A.A., Shpakov A.O.**

Sechenov Institute  
of Evolutionary Physiology and Biochemistry

of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

**Corresponding author:**

Alexander O. Shpakov  
Sechenov Institute  
of Evolutionary Physiology and Biochemistry  
of the Russian Academy of Sciences,  
Torez ave. 44, Saint Petersburg, Russia,  
194223  
E-mail: alex\_shpakov@list.ru

*Received 02 June 2016; accepted  
09 September 2016.*

////////////////////////////////////

### Abstract

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) play an important role in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus (T2DM) and metabolic syndrome (MS), and it can be regarded as one of the targets in their treatment. However, the data on changes in the G6PD activity in these diseases are scarce. The aim of this work was to study the G6PD activity in the brain, myocardium and epididymal fat (EF) in male rats with T2DM and MS and the influence of long-term treatment with antidiabetic drug metformin (MF) on it. To induce T2DM, five-day rat pups were treated with streptozotocin (75 mg/kg). The MS in rats was induced by diet consisting of 30% glucose solution and saturated fats. The treatment of T2DM and MS was carried out at a daily dose 200 mg/kg for 5 or 10 weeks. It was shown that in the brain of rats with T2DM and MS the G6PD activity changed weakly. In the myocardium and EF in rats with T2DM and MS the G6PD activity significantly increased. The treatment of animals with MF led to decrease of this activity, and in the myocardium of rats with T2DM the enzyme activity reached its level in control. Thus, we showed that in the myocardium and EF of rats with T2DM and MS the G6PD activity was significantly increased, and the MF treatment normalized it, which is one of the mechanisms of therapeutic action of MF.

**Key words:** glucose-6-phosphate dehydrogenase, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, metformin, myocardium, epididymal fat.

*For citation: Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2016; 3 (4): 34–43.*

### Введение

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ), ключевой и скорость-лимитирующий фермент пентозофосфатного пути (ПФП), направляет поток углеводов в пентозофосфатный путь (ПФП) и определяет окислительно-восстановительный баланс клетки, осуществляя синтез восстановленной формы НАДФ [1, 2]. Следует отметить, что экспрессия и активность Г6ФДГ характеризуются тканевой специфичностью. В наибольшей степени исследована активность фермента печени, ее регуляция

гормонами и изменения при различной диете [3, 4]. При действии инсулина наблюдается увеличение экспрессии и активности Г6ФДГ в печени. Увеличение экспрессии и активности фермента также выявлено при обработке инсулином адипоцитов бурого жира [4].

Поскольку при сахарном диабете (СД) 2-го типа и при метаболическом синдроме (МС) нарушается чувствительность тканей к инсулину, то можно предположить, что это ведет к изменению функциональной активности Г6ФДГ и, как следствие, вызы-

вает нарушение окислительно-восстановительного баланса в тканях. Вследствие этого можно предположить, что изменения активности Г6ФДГ могут быть одним из триггеров развития окислительного стресса и воспалительных реакций при СД 2-го типа и МС [5]. Имеются данные о том, что при СД 2-го типа и патологическом ожирении активность Г6ФДГ, экспрессия кодирующего его гена и внутриклеточный уровень НАДФН, как правило, повышаются, что приводит к активации НАДФН оксидазы, повышению продукции супероксидов-радикалов, усилению окислительного стресса и деструктивным процессам в тканях [1, 3, 5-7]. Однако имеющиеся в настоящее время данные об изменении активности Г6ФДГ в тканях (за исключением печени) при СД 2-го типа и МС немногочисленны и противоречивы. Практически не исследовано влияние на активность Г6ФДГ длительного лечения пациентов с СД 2-го типа и МС антидиабетическим препаратом метформином (МФ). В настоящее время МФ, являющийся активатором АМФ-зависимой протеинкиназы, широко применяется для лечения пациентов с СД 2-го типа и МС. В основе действия МФ лежит улучшение гликемического контроля, повышение чувствительности тканей к инсулину, нормализация липидного обмена [8, 9]. Изучение влияния длительного воздействия МФ на активность Г6ФДГ в различных тканях позволит не только выяснить молекулярные механизмы его действия на систему антиоксидантной защиты и окислительно-восстановительный баланс клеток в условиях метаболических расстройств, но и оптимизировать схему применения препарата с учетом его новых молекулярных мишеней.

Цель предпринятого нами исследования состояла в изучении активности Г6ФДГ в мозге, миокарде и эпидидимальном жире (ЭЖ) самцов крыс с СД 2-го типа и МС и в оценке влияния на нее длительного лечения животных МФ.

### Материалы и методы

Исследовали две модели метаболических расстройств — неонатальную модель СД 2-го типа, вызываемую введением пятисуточным крысятам стрептозотоцина (СТЗ) в дозе 75 мг/кг [10, 11], и модель МС, вызванную комбинацией высокожировой и высокоуглеводной диет [12]. Комбинированная диета, которую крысы начали получать с четырехнедельного возраста, включала ежедневное потребление крысами 30%-ного раствора сахарозы вместо питьевой воды и 5 г животного жира. У крыс с неонатальной моделью к трехмесячному возрасту развился СД 2-го типа с характерной для него умеренной гипергликемией и нарушенной толерантностью

к глюкозе, которую оценивали в глюкозотолерантном тесте (ГТТ), что хорошо соответствует данным других авторов и нашим данным [10-12]. У крыс с моделью МС после двухмесячной комбинированной диеты также отмечали нарушенную толерантность к глюкозе, но менее выраженную в сравнении с животными с неонатальной моделью СД 2-го типа. Во всех исследуемых группах число животных составляло  $n=6$ . Часть крыс с СД 2-го типа (группы К, СД) в возрасте 100 дней были декапитированы под наркозом для изучения активности Г6ФДГ. Оставшиеся крысы с СД 2-го типа и МС были разделены на 9 групп (54 крысы): 3 группы (СД-2, МС-1 и МС-2) с СД 2-го типа или МС без лечения МФ (Sigma, США) и 3 группы с СД 2-го типа или МС с лечением МФ разной продолжительности — МСМ-1 (5 недель), СДМ-2 и МСМ-2 (10 недель) и еще 3 группы контрольных крыс (К-1, К-2 и К-3). Контрольным животным и группам крыс с СД 2-го типа или МС без лечения вместо МФ в те же сроки вводили плацебо. Группы МС-1 и МСМ-1 были наркотизированы и декапитированы через 5 недель, а группы СД-2, МС-2, СДМ-2 и МСМ-2 — через 10 недель после начала эксперимента. У животных извлекали ткани мозга (кору больших полушарий, стриатум, гиппокамп), миокард, который отделяли от предсердий и сердечных клапанов, и ЭЖ. Все эксперименты выполняли в строгом соответствии с правилами, разработанными и утвержденными Этическим Комитетом ИЭФБ РАН (23.12.2010), а также в соответствии с правилами и требованиями, предусмотренными Директивой 1986 Европейского парламента (European Communities Council Directive 1986) и изложенными в Руководстве по уходу и использованию лабораторных животных (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2010). Толерантность к глюкозе оценивали с помощью ГТТ, для чего крысам в/б вводили раствор глюкозы (2 г/кг), и измеряли концентрацию глюкозы в крови животных через 15, 30, 60 и 120 мин после глюкозной нагрузки. Уровень глюкозы определяли в цельной крови крыс, полученной из хвостовой вены, с использованием тест-полосок One Touch Ultra (США) и глюкометра Life Scan Johnson & Johnson (Дания).

Для определения активности Г6ФДГ (НФ 1.1.1.49) ткани гомогенизировали в 50 мМ Трис-НСI-буфере (pH 8.0), содержащем 0.15 М КСI (1:1) и ингибиторы протеаз. Соотношение ткани и буфера составило 1:10. Поскольку изучаемый фермент является цитозольным (растворимым) белком, полученный гомогенат центрифугировали (2400 г, 10 мин) при охлаждении и активность Г6ФДГ определяли в супернатанте. Активность Г6ФДГ определяли с помощью метода [13] с неко-

**Таблица 1. Масса тела, сердца, эпидидимального и абдоминального жира и метаболические показатели у крыс с сахарным диабетом 2-го типа и метаболическим синдромом и у контрольных животных и влияние на них лечения метформинном**

| Показатели                        | Группы животных |              |              |             |              |              |             |              |              |
|-----------------------------------|-----------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
|                                   | К-2             | СД-2         | СДМ-2        | К-1         | МС-1         | МСМ-1        | К-3         | МС-2         | МСМ-2        |
| Масса тела, г                     | 319±19          | 298±25       | 292±22       | 291±16      | 369±21*      | 303±17#      | 318±19      | 395±23*      | 344±28       |
| Масса сердца, г                   | 0.76±0.08       | 0.78±0.07    | 0.73±0.05    | 0.76±0.04   | 0.91±0.06*   | 0.86±0.09    | 0.75±0.04   | 0.94±0.07*   | 0.89±0.11    |
| Эпидидимальный жир, г             | 2.7±0.5         | 1.9±0.5      | 1.9±0.4      | 2.5±0.3     | 2.9±0.5      | 2.4±0.4      | 3.5±0.5     | 5.9±0.7*     | 4.8±0.7      |
| Абдоминальный жир, г              | 2.6±0.7         | 2.1±0.6      | 2.3±0.5      | 3.0±0.4     | 8.9±0.6*     | 6.3±0.5#     | 3.3±0.6     | 10.4±0.9*    | 6.2±0.7#     |
| Триглицериды, мМ                  | 0.84±0.13       | 1.37±0.14*   | 1.21±0.18    | 0.80±0.21   | 1.53±0.22*   | 1.04±0.15#   | 0.85±0.22   | 1.74±0.27*   | 1.14±0.20#   |
| Общий холестерин, мМ              | 4.58±0.37       | 5.89±0.28*   | 5.45±0.36    | 4.47±0.23   | 6.24±0.33*   | 5.37±0.32#   | 4.32±0.25   | 6.47±0.47*   | 5.55±0.27#   |
| Холестерин-ЛПВП, мМ               | 2.79±0.27       | 2.49±0.19    | 2.76±0.23    | 2.67±0.24   | 2.52±0.24    | 2.71±0.38    | 2.74±0.24   | 2.24±0.37    | 2.83±0.35    |
| Холестерин-ЛПНП, мМ               | 1.52±0.28       | 2.50±0.18*   | 2.09±0.29    | 1.48±0.17   | 2.85±0.28*   | 2.14±0.12#   | 1.60±0.33   | 3.22±0.28*   | 2.31±0.26#   |
| Соотношение холестерина-ЛПНП/ЛПВП | 0.545±0.031     | 1.004±0.020* | 0.757±0.033# | 0.554±0.025 | 1.131±0.034* | 0.790±0.020# | 0.584±0.036 | 1.438±0.049* | 0.816±0.041# |

Примечание: Обозначения групп приведены в методике. Все показатели измерены в конце эксперимента,  $M \pm SD$ , в каждой группе  $n=6$ .

\* Различия между контрольными крысами и животными с СД 2-го типа или МС достоверны при  $P < 0.05$ .

# Различия между лечеными и не лечеными метформинном группами животных достоверны при  $P < 0.05$ .

торыми модификациями [14]. В пробу объемом 2 мл последовательно добавляли реактивы в конечной концентрации: 50 мМ Трис-НС1 (рН 8.0), 1.0 мМ  $MgCl_2$ , 0.1 мМ НАДФ, 0.2 мМ глюкоза-6-фосфата и 0.2 мМ 6-фосфоглюконата и 0.1–0.2 мл супернатанта, полученного после центрифугирования. В этом случае измеряли активность двух дегидрогеназ — Г6ФДГ и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы. В параллельные пробы добавляли те же реактивы, но без 0.2 мМ глюкоза-6-фосфата, что позволяло определить активность только 6-фосфоглюконатдегидрогеназы. Контролем служила проба того же состава, но без субстратов. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Spekol (Karl Zeiss, Германия) при длине волны 340 нм в течение 10 мин протекания реакции. Активность фермента оценивали по увеличению оптической плотности во времени при превращении НАДФ в НАДФН.

Активность Г6ФДГ определяли вычитанием активности 6-фосфоглюконатдегидрогеназы из общей активности для двух ферментов, и выражали в нмоль НАДФН/мин на мг белка.

В работе использовали глюкозо-6-фосфат, 6-фосфоглюконат, НАДФ производства фирмы «Sigma» (США). Белок определяли с помощью метода Лоури, в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы «Microsoft Office Excel 2007». Данные представлены в виде  $M \pm SD$  из трех независимых экспериментов. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали  $t$ -критерий Стьюдента, для сравнения трех и более групп — дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Различия оценивали как достоверные при  $P < 0.05$ .

**Таблица 2. Уровень глюкозы в глюкозотолерантном тесте у крыс с сахарным диабетом 2-го типа и метаболическим синдромом с лечением и без лечения метформином**

| Группа крыс   | Концентрация глюкозы, ммоль/л |           |           |           |           |
|---|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|   | 0 мин                         | 15 мин    | 30 мин    | 60 мин    | 120 мин   |
| Модель СД 2-го типа, группа СДМ-2 получала лечение МФ в течение 10 недель |                               |           |           |           |           |
| К-2   | 4.1±0.5                       | 17.2±2.8  | 14.9±2.9  | 7.3±1.5   | 4.7±0.8   |
| СД-2  | 6.1±0.6*                      | 17.4±3.5* | 20.1±1.8* | 20.4±4.0* | 12.1±1.7* |
| СДМ-2   | 4.7±0.4#                      | 16.3±3.7  | 16.4±3.0  | 13.8±3.9  | 8.1±1.5#  |
| Модель МС, группа МСМ-1 получала лечение МФ в течение 5 недель            |                               |           |           |           |           |
| К-1   | 4.1±0.2                       | 14.9±1.9  | 12.4±2.0  | 7.2±1.3   | 4.9±0.5   |
| МС-1  | 5.3±0.4*                      | 15.8±2.5  | 16.2±3.3  | 12.1±1.5* | 8.8±0.7*  |
| МСМ-1   | 4.6±0.5                       | 15.2±2.8  | 12.7±2.9  | 7.9±1.4#  | 4.7±0.7#  |
| Модель МС, группа МСМ-2 получала лечение МФ в течение 10 недель           |                               |           |           |           |           |
| К-3   | 4.3±0.2                       | 14.2±2.2  | 11.3±1.8  | 7.0±1.1   | 5.0±0.7   |
| МС-2  | 5.8±0.4*                      | 16.8±3.7  | 15.7±2.8  | 12.9±1.7* | 9.6±0.7*  |
| МСМ-2   | 4.5±0.3#                      | 14.9±2.0  | 11.0±2.9  | 8.4±1.2#  | 6.4±0.5#  |

Примечание: Все показатели измерены в конце эксперимента,  $M \pm SD$ , в каждой группе  $n=6$ .

\* Различия между контрольными крысами и животными с СД 2-го типа или МС достоверны при  $P < 0.05$ .

# Различия между лечеными и не лечеными метформином группами животных достоверны при  $P < 0.05$ .

### Результаты

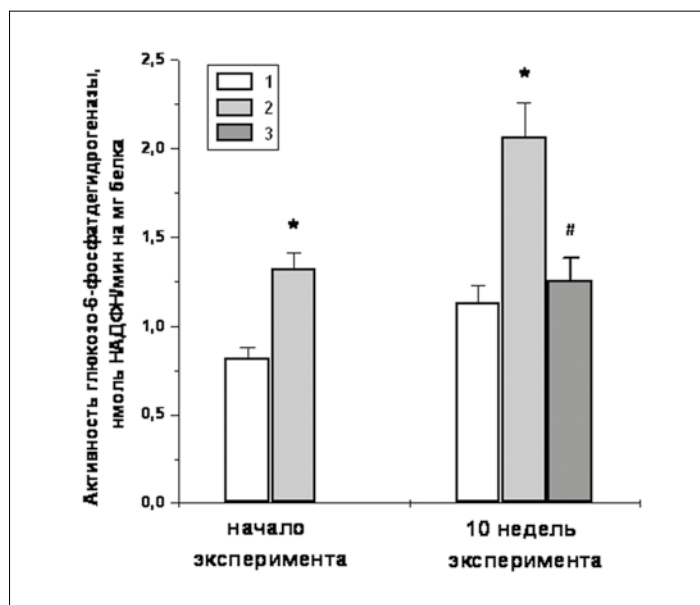
Масса тела, масса сердца и жировой ткани (ЭЖ, абдоминальный жир) у крыс с неонатальной моделью СД 2-го типа существенно не отличались от таковых у контрольных животных, и лечение МФ заметно не влияло на эти показатели (табл. 1). Эти данные хорошо соответствуют данным литературы, поскольку при неонатальной модели заболевания не отмечается заметного повышения массы тела и количества жира [10, 12]. В то же время у МС-крыс масса тела, а также масса сердца и жировой ткани были выше, чем в контроле (табл. 1). Лечение МС-крыс МФ приводило к значительному снижению массы тела и жировой ткани. В группе МСМ-2 также отмечали тенденцию к снижению массы сердца, но различия с не лечеными МС-крысами в этом случае не были статистически значимыми. В группах СД-2, МС-1 и МС-2 был нарушен липидный обмен, на что указывает повышение уровня триглицеридов, общего холестерина, холестерина–ЛПНП и соотношения холестерин–ЛПНП/холестерин–ЛПВП (табл. 1). Лечение животных с помощью МФ приводило в случае МС к снижению массы тела и абдоминального жира и нормализации показателей липидного обмена. У крыс с СД 2-го типа и МС отмечали снижение толерантности к глюкозе, на что указывает достоверно более высокий уровень глюкозы на всем

протяжении ГТТ в группе СД-2 и через 60 и 120 мин после глюкозной нагрузки в группах МС-1 и МС-2. Лечение крыс МФ приводило к повышению толерантности глюкозы у крыс с этими моделями, но в случае МС-крыс этот эффект был выражен сильнее (табл. 2).

При изучении активности Г6ФДГ в тканях мозга крыс с СД 2-го типа и МС не было выявлено заметных различий в сравнении с контролем, а лечение животных МФ сравнительно слабо влияло на активность фермента. Так, в мозге диабетических крыс с лечением и без лечения МФ активность Г6ФДГ составила  $8.1 \pm 0.4$  и  $8.6 \pm 0.7$  нмоль НАДФН/мин на мг белка, и существенно не отличалась от таковой в контроле ( $7.9 \pm 0.6$  нмоль НАДФН/мин на мг белка). В мозге крыс групп МС-1, МСМ-1, МС-2 и МСМ-2 активность фермента составила  $5.9 \pm 0.3$ ,  $6.4 \pm 0.5$ ,  $6.7 \pm 0.3$  и  $7.4 \pm 0.7$  нмоль НАДФН/мин на мг белка, и эти значения были близки таковым в группах К-1 и К-3 ( $6.7 \pm 0.4$  и  $6.6 \pm 0.3$  нмоль НАДФН/мин на мг белка).

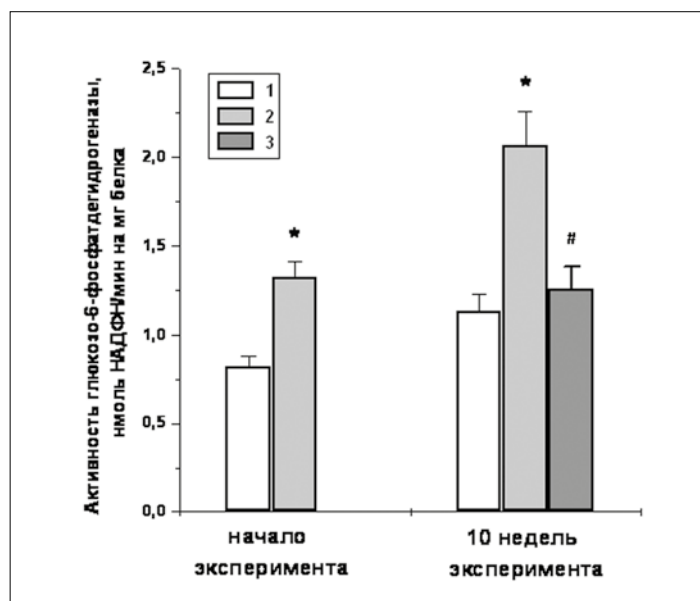
В миокарде крыс СД 2-го типа отмечали достоверное повышение активности Г6ФДГ, которое усиливалось при увеличении продолжительности заболевания (группа СД-2). Лечение МФ снижало активность фермента до ее уровня в контроле (рис. 1). В миокарде крыс с МС также выявлено отчетливо

**Рисунок 1. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) в миокарде крыс с моделью сахарного диабета 2-го типа и влияние на нее лечения метформинном**



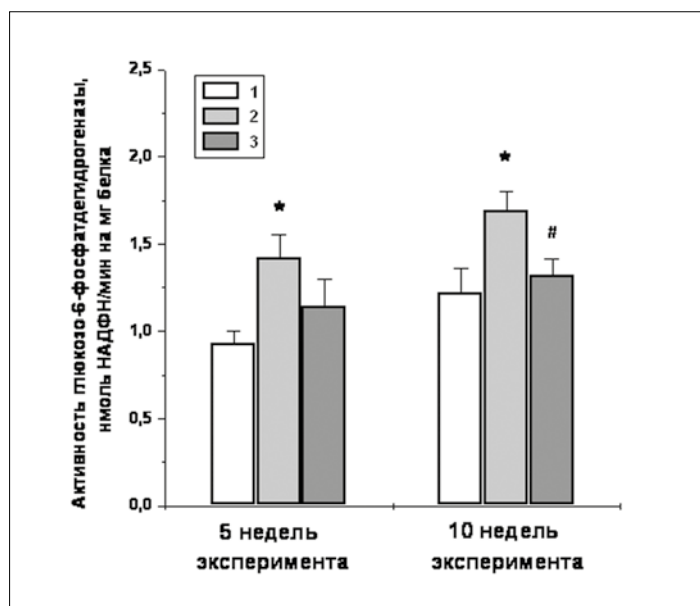
1 — получавшие плацебо контрольные крысы, по возрасту соответствующие сроку начала (К) и окончания лечения (10 недель, К-2), 2 — получавшие плацебо крысы с СД 2-го типа, по возрасту соответствующие сроку начала (СД) и окончания лечения (10 недель, СД-2), 3 — крысы с СД 2-го типа, получавшие лечение МФ в течение 10 недель (СДМ-2). По вертикали — активность фермента (нмоль НАДФН/мин на мг белка). \* — различия между контрольными и диабетическими крысами, и # — различия между группами СД-2 и СДМ-2 статистически значимы при  $p < 0.05$ .

**Рисунок 2. Активность Г6ФДГ в миокарде крыс с метаболическим синдромом (МС) и влияние на нее лечение МФ**



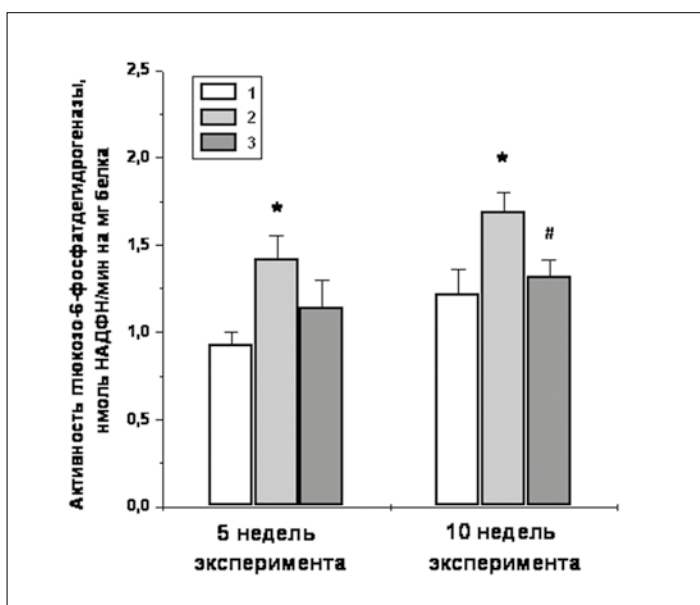
1 — получавшие плацебо контрольные крысы, по возрасту соответствующие сроку лечения 5 (К-1) и 10 недель (К-3), 2 — получавшие плацебо крысы с МС, по возрасту соответствующие сроку лечения 5 (СД) и 10 недель (СД-2), 3 — крысы с МС, получавшие лечение МФ в течение 5 (МС-1) и 10 недель МФ (МС-2). По вертикали — активность фермента (нмоль НАДФН/мин на мг белка). \* — различия между контрольными и МС-крысами, и # — различия между МС-крысами с лечением и без лечения МФ статистически значимы при  $p < 0.05$ .

**Рисунок 3. Активность Г6ФДГ в эпидидимальном жире (ЭЖ) крыс с СД 2-го типа и влияние на нее лечения метформином.**



Обозначения, как на рис. 1.

**Рисунок 4. Активность Г6ФДГ в ЭЖ крыс с МС и влияние на нее лечения метформином.**



Обозначения, как на рис. 2.

выраженное повышение активности Г6ФДГ. Лечение МС-крыс с помощью МФ снижало активность Г6ФДГ, хотя ее уровень оставался несколько выше такового в контроле (рис. 2). Следует отметить, что с повышением возраста отмечали небольшое возрастание активности фермента в миокарде контрольных крыс. Таким образом, длительное лечение МФ восстанавливает активность Г6ФДГ в миокарде

крыс с СД 2-го типа и МС, что может лежать в основе улучшения функций сердечно-сосудистой системы при этих метаболических расстройствах.

В ЭЖ крыс с обоими сроками СД2 активность Г6ФДГ была повышена, в наибольшей степени при более длительном течении заболевания. Лечение МФ на 21% снижало активность фермента, но она оставалась достоверно выше ее уровня в контроле

(рис. 3). В группах МС-1 и МС-2 отмечали значительное повышение активности Г6ФДГ в ЭЖ, которое по величине соответствовало таковому в группе СД-2. При этом лечение МФ в случае МС-крыс было более эффективным, чем при лечении крыс с СД 2-го типа, и снижало активность Г6ФДГ на 34 и 39%, до ее уровня, близкого к таковому в контроле (рис. 4). Выявленное нами снижение активности липогенного фермента Г6ФДГ в ЭЖ хорошо согласуется со способностью МФ ускорять липолиз и снижать массу жировой ткани.

### Обсуждение

У крыс с неонатальной моделью СД 2-го типа и с моделью МС, вызванной комплексной высокоуглеводной и высокожировой диетой, нарушается толерантность к глюкозе, повышается уровень глюкозы натощак. У МС-крыс также повышается масса тела и жировой ткани, что указывает на развитие у них ожирения, являющегося характерным признаком МС, и увеличивается размер сердца, что указывает на развитие гипертрофии миокарда [15]. Лечение МФ экспериментальных животных с СД 2-го типа и МС оказывает гипогликемический и липолитический эффект, что выражается в снижении уровня глюкозы натощак и восстановлении толерантности к глюкозе, в повышении чувствительности тканей к инсулину, в снижении массы тела и, в первую очередь, массы жировой ткани, а также в улучшении липидного метаболизма [7, 8, 15]. Эти эффекты метформиновой терапии хорошо согласуются с нашими данными. Нами показано, что длительное, на протяжении 10 недель, лечение МФ крыс с неонатальной моделью СД 2-го типа снижает уровень глюкозы и частично восстанавливает толерантность к глюкозе. В свою очередь, длительное лечение МФ крыс с МС приводит к улучшению толерантности к глюкозе и снижению массы тела и жировой ткани. В основе терапевтического эффекта МФ лежит его способность усиливать функциональную активность АМФ-зависимой протеинкиназы, являющейся основным энергетическим сенсором клетки, которая вовлечена в регуляцию глюконеогенеза и липогенеза в печени и других периферических тканях. В соответствии с этим большой интерес представляет изучение влияния длительной терапии МФ на активность Г6ФДГ, одного из ключевых ферментов углеводного и липидного метаболизма, который функционально связан с АМФ-зависимой протеинкиназой [16-18]. Продуктом катализируемой Г6ФДГ реакции является восстановленная форма НАДФ — НАДФН, важнейший кофактор для биосинтеза и окисления жирных кислот, образования оксида азота, генерации восстановленного глутатиона,

а также субстрат для НАДФН-оксидазы. Фермент НАДФН-оксидаза участвует в образовании супероксидных радикалов, и таким образом контролирует окислительно-восстановительные, апоптотические и воспалительные процессы в клетке.

У исследованных нами крыс с СД 2-го типа активность Г6ФДГ в миокарде и ЭЖ повышалась, причем увеличение продолжительности заболевания приводило к более выраженному изменению активности фермента. Это указывает на взаимосвязь между длительностью метаболического расстройства и вызванными этим функциональными нарушениями и активностью Г6ФДГ в этих тканях. В мозге заметных изменений активности фермента не отмечалось, что согласуется с данными о том, что в ЦНС энергетический обмен и нарушение окислительно-восстановительного баланса при диабетической патологии выражены слабее, чем на периферии, и развиваются, как правило, при очень длительных и тяжелых формах заболеваний [2, 16].

Другие авторы также выявили функциональные изменения активности Г6ФДГ в различных тканях при СД, но эти изменения сильно зависели от типа СД, модели заболевания и его тяжести [1]. Так, у крыс с различными моделями СД 1-го типа активность Г6ФДГ и уровень НАДФН, как правило, снижались. Это было показано для печени, сердца, поджелудочной железы, почки, хрусталика, клеток крови [1, 3, 5]. В то же время при СД 2-го типа и патологическом ожирении активность фермента и экспрессия гена, кодирующего Г6ФДГ, напротив, повышались. Так, повышение экспрессии гена для Г6ФДГ было отмечено в адипоцитах мутантных db/db и ob/ob мышей с ожирением и мышей с ожирением, вызванным высокожировой диетой, а также в культуре адипоцитов, инкубированных в среде с высоким содержанием глюкозы [3, 5]. В печени мутантных fa/fa крыс с ожирением были повышены экспрессия гена для Г6ФДГ, ее активность и внутриклеточный уровень НАДФН [1]. При этом было отмечено, что повышение активности Г6ФДГ в печени fa/fa крыс приводит к активации НАДФН-оксидазы и повышению продукции супероксид-радикалов, что ведет к усилению окислительного стресса и деструктивным процессам в гепатоцитах. Ингибирование Г6ФДГ с помощью 6-аминоникотинамида и дигидроэпиандростерона приводит к снижению уровня супероксид-радикалов и оказывает на клетки печени защитный эффект [1, 17]. Авторами была выявлена положительная корреляция между гипертрофией печени и увеличением активности Г6ФДГ, а также между гипертрофией печени и образованием супероксид-радикалов. Показано, что повышение экс-



прессии гена для Г6ФДГ и стимуляция активности фермента осуществляются через сигнальные каскады, включающие фосфатидилинозитол-3-киназу и нерецепторные тирозинкиназы Src-семейства. В пользу этого свидетельствует и тот факт, что инсулин, который является активатором фосфатидилинозитол-3-киназы и нижележащих 3-фосфоинозитидных каскадов, усиливает экспрессию гена для Г6ФДГ в гепатоцитах [6].

Согласно нашим данным, бигуанид МФ, который в настоящее время является одним из наиболее широко применяемых для лечения СД 2-го типа и МС препаратом, при длительном лечении им крыс с СД 2-го типа и МС в значительной степени восстанавливал активность Г6ФДГ. При этом в миокарде крыс с СД 2-го типа активность фермента при лечении МФ нормализовалась полностью, снижаясь до ее уровня в контроле. В основе терапевтического действия МФ лежит его способность улучшать углеводный и липидный метаболизм, а также нормализовать окислительно-восстановительный баланс в тканях, в том числе в миокарде [8, 9, 17]. Основываясь на этом, мы полагаем, что восстановление функциональной активности Г6ФДГ является одним из ключевых молекулярных механизмов действия МФ [5, 9].

Таким образом, нами впервые показано, что в миокарде и ЭЖ крыс с СД 2-го типа и МС повышается активность Г6ФДГ, а лечение МФ нормализует активность фермента, что может являться одним из механизмов терапевтического действия МФ.

Работа поддержана Российским Научным Фондом (проект 14-15-00413).

#### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

#### Список литературы / References

1. Gupte RS, Floyd BC, Kozicky M, et al. Synergistic activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NAD(P)H oxidase by Src kinase elevates superoxide in type 2 diabetic, Zucker *fa/fa*, rat liver. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47(3): 219–228.
2. Rosa AP, Jacques CE, de Souza LO, et al. Neonatal hyperglycemia induces oxidative stress in the rat brain: the role of pentose phosphate pathway enzymes and NADPH oxidase. *Mol. Cell. Biochem*. 2015; 403(1-2):159–167.
3. Park J, Choe SS, Choi AH, et al. Increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase in adipocytes stimulates oxidative stress and inflammatory signals. *Diabetes*. 2006; 55(11):2939–2949.
4. Kletzien RF, Harris PKW, Foellmi L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to

tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J*. 1994; 8(1):174–181.

5. Zimmer HG. Regulation of and intervention into the oxidative pentose phosphate pathway and adenine nucleotide metabolism in the heart. *Mol. Cell. Biochem*. 1996; 160-161(1): 101–109.

6. Park J, Rho HK, Kim KH, et al. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity. *Mol. Cell. Biol*. 2005; 25(12):5146–5157.

7. Wu C, Wang F, Lu J, Zhao Y. Roles of glucose-6-phosphate dehydrogenase in obesity induced by high fat diet. *Wei Sheng Yan Jiu=Journal of hygiene research*. 2013; 42(3):447–450.

8. Mithieux G, Guignot L, Bordet JC, Wiernsperger N. Intrahepatic mechanisms underlying the effect of metformin in decreasing basal glucose production in rats fed a high-fat diet. *Diabetes*. 2002; 51(1):139–143.

9. Sena CM, Matafome P, Louro T, et al. Metformin restores endothelial function in aorta of diabetes rats. *Br. J. Pharmacol*. 2011; 163(2):424–427.

10. Shpakov AO, Chistyakova OV, Derkach KV, et al. Intranasal insulin affects adenylyl cyclase system in rat tissues in neonatal diabetes. *Central Eur. J. Biol*. 2012; 7(1):33–47.

11. Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, et al. High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 2011; 57(5): 611–624.

12. Hemmings SJ, Spafford D. Neonatal STZ model of type II diabetes mellitus in the Fischer 344 rat: characteristics and assessment of the status of the hepatic adrenergic receptors. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*. 2000; 32(8):905–919.

13. Tian WN, Braunstein LD, Pang J, et al. Importance of glucose -6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *J. Biol. Chem*. 1998; 273(17):10609–10617.

14. Kuznetsova LA, Plesneva SA, Shpakov AO, Sharova TS. Stimulatory Effect of Insulin and Epidermal Growth Factor on Activity of Protein Kinase A, Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, and Glycogen Synthase in Skeletal Muscles of Chick Embryos and Chickens. *Journal of evolutionary biochemistry and physiology*. 2004; 40(4): 409-419. [Кузнецова Л.А., Плеснева С.А., Шпаков А.О., Шарова Т.С. Стимулирующее влияние инсулина и эпидермального фактора роста на активность протеинкиназы А, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и гликогенсинтетазы в скелетных мышцах кур в эмбриогенезе. *Журн. эвол. биохим. физиол*. 2004; 40(4):325–333].

15. Derkach KV, Kuznetsova LA, Sharova TS, Ignatieva VM, Bondareva VM, Shpakov AO. The effects of long-term metformin treatment on the activity of adenylyl cyclase system and NO-synthases in the brain and the myocardium of rats and obesity. *Tsitologiya=Cell and tissue biology*. In Russian. [Деркач К.В., Кузнецова Л.А., Шарова Т.С. и др. Эффект долговременной обработки метформином на активность аденилатциклазной системы и NO-синтаз в мозге и миокарде крыс с ожирением. *Цитология*. 2015; 57(5):360–369].

16. Ulusu NN, Sahilli M, Avci A, et al. Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defence during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E. *Neurochem. Res*. 2003; 28(6):815–823.

17. Aragno M, Tamagno E, Gatto V, et al. Dehydroepiandrosterone protect tissues of streptozotocin-treated

rats against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 26(11-12): 1487–1474.

18. Tabidi I, Saggerson D. Inactivation of the AMP-activated protein kinase by glucose in cardiac myocytes: a role for the pentose phosphate pathway. *Biosci Rep.* 2012; 32(3):229-39.

#### **Информация об авторах:**

Кузнецова Людмила Александровна — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН;

Деркач Кира Викторовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН;

Шарова Татьяна Сергеевна — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН;

Бондарева Вера Михайловна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН;

Ложков Алексей Александрович — студент 1-го курса магистратуры Санкт-Петербургского Политехнического Университета Петра Великого;

Шпаков Александр Олегович — доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии и нейрохимии ИЭФБ РАН.

#### **Author information:**

Ludmila A. Kuznetsova, Doctor of biological sciences, Researcher, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia;

Kira V. Derkach, PhD, Researcher, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia;

Tatiana S. Sharova, Junior Researcher, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia;

Vera M. Bondareva, PhD, Researcher, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia;

Alexey A. Lozhkov, Master student, Peter the Great Saint-Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia;

Alexander O. Shpakov, Doctor of biological sciences, head of the laboratory of molecular endocrinology and neurochemistry, Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and of the Russian of Sciences, Saint Petersburg, Russia.