

**ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ МЕТФОРМИНОМ  
НА АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ И НО-СИНТАЗ  
В МОЗГЕ И МИОКАРДЕ КРЫС С ОЖИРЕНИЕМ**

© К. В. Деркач, Л. А. Кузнецова, Т. С. Шарова, П. А. Игнатьева,  
В. М. Бондарева, А. О. Шпаков<sup>1</sup>

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург;

<sup>1</sup> электронный адрес: alex\_shpakov@list.ru

Бигуанид метформин, который широко применяется для лечения сахарного диабета 2-го типа, улучшает показатели углеводного и липидного обменов и оказывает выраженное кардио- и нейропротекторное действие. Предполагается, что важную роль в реализации этих эффектов играет способность метформина положительно влиять на активность NO-сингтаз, катализирующих синтез NO — важнейшего вазодилататора — и на активность гормоночувствительной аденилатциклазной сигнальной системы (АЦСС). Для доказательства этого нами было предпринято исследование, целью которого являлось изучение влияния длительного лечения метформином крыс с ожирением на их метаболические показатели, а также на активность АЦСС и NO-сингтаз в миокарде и мозге животных. Обработку метформином крыс Wistar с ожирением, вызванным высокожировой диетой, проводили в течение 2 мес (суточная доза 200 мг/кг). Лечение метформином приводило к снижению массы тела и жировой ткани, снижению уровня глюкозы и инсулина, а также индекса инсулиновой резистентности HOMA-IR, улучшало толерантность к глюкозе и снижало уровень атерогенных форм холестерина. В миокарде крыс с ожирением наблюдали ослабление стимуляции АЦСС агонистами  $\beta_1/\beta_2$ -адренергических рецепторов (АР) и усиление  $\beta_3$ -АР-сигнализации. В то же время в миокарде животных, леченных метформином, регуляция АЦСС адренергическими агонистами восстанавливалась, а соотношение  $\beta$ -АР-сигнальных путей нормализовалось. В мозге леченных метформином крыс восстанавливались стимулирующие аденилатциклазу эффекты серотонина и агонистов меланокортиковых рецепторов 4-го типа, ослабленные при ожирении. Метформин полностью восстанавливал общую активность NO-сингтаз и активность эндотелиальной NO-сингтазы в миокарде, сниженные при ожирении. Показано также, что обработка метформином вызывала гиперактивацию NO-сингтаз в мозге и миокарде здоровых животных. Сделан вывод о том, что выявленные эффекты метформина при длительном лечении крыс с ожирением могут лежать в основе кардио- и нейропротекторного действия этого препарата.

**Ключевые слова:** метформин, аденилатциклаза, NO-сингтаза, ожирение, адренергический receptor, серотонин, мозг, миокард, вазодилатация.

**Принятые сокращения:** АЦ — аденилатциклаза, АЦСС — аденилатциклазная сигнальная система, ГТТ — глюкозотолерантный тест, Х-ЛПВП и Х-ЛПНП — холестерин, связанный с липопротеидами высокой и низкой плотности соответственно, 5-НОТ — 5-норникотинамид, ПК — протеинкиназа, СД — сахарный диабет, eNOS и nNOS-эндотелиальная и нейрональная NO-сингтаза соответственно, G<sub>s</sub>- и G<sub>i</sub>-белки — гетеротримерные G-белки стимулирующего или ингибирующего типа соответственно, HOMA-IR — индекс инсулиновой резистентности (homeostasis model assessment — insulin resistance).

Бигуанид метформин является одним из наиболее широко используемых лекарственных препаратов для лечения сахарного диабета (СД) 2-го типа (Nathan et al., 2006). Имеются данные, указывающие на перспективность его применения для лечения пациентов с ожирением (Diabetes prevention program research group, 2002), а также для предотвращения развития у них сердечно-сосудистой патологии (Grant, 2003). Предполагается, что важную роль в реализации кардиопротекторного эффекта метформина при лечении пациентов, страдающих СД 2-го типа и метаболическим синдромом, играет его влияние на активности NO-сингтаз и гормоночувствительной

аденилатциклазной сигнальной системы (АЦСС). NO-сингтаза катализирует синтез оксида азота (NO), обладающего выраженным сосудорасширяющим действием, АЦСС ответственна за синтез цАМФ и контролирует цАМФ-зависимые сигнальные каскады и транскрипционные факторы. Показано, что обработка метформином усиливает сигнальные пути, ответственные за продукцию NO, приводит к снижению концентрации активных форм кислорода, в первую очередь O<sub>2</sub><sup>-</sup>, повышая, таким образом, биодоступность NO (Bailey, 2008; Lobato et al., 2012). Обнаружено также, что в условиях гипергликемии и инсулиновой резистентности метформин повышает

чувствительность клеток сосудов к действию норадреналина — агониста адренергических рецепторов, одного из важнейших регуляторов АЦСС (Lobato et al., 2012), что свидетельствует в пользу способности метформина влиять на регулируемые адренергическими агонистами цАМФ-зависимые сигнальные каскады в гладкомышечных клетках сосудов. Однако данные о молекулярных механизмах действия метформина, лежащих в основе его терапевтического действия на сердечно-сосудистую систему и ЦНС у пациентов с ожирением, немногочисленны и противоречивы (Leverve et al., 2003; Hardie, 2013; Rena et al., 2013). Несмотря на то что имеются свидетельства в пользу улучшения метаболических показателей и функций сосудов у экспериментальных животных с ожирением при их лечении метформином (Lobato et al., 2012), исследований по влиянию такого лечения на функциональную активность АЦСС и NO-синтаз в миокарде и мозге животных с ожирением не проводилось. В этой связи необходимо отметить, что функциональная активность аденилатциклазной и NO-синтазной систем, играющих исключительно важную роль в контроле вазодилатации и макро- и микроциркуляции крови при ожирении, инсулиновой резистентности и дислипидемии, в значительной степени нарушена (Moniotte et al., 2001; Anfossi et al., 2002; Шпаков и др., 2006; Feletou, Vanhoutte, 2006; Rozec, Gauthier, 2006; Rattigan et al., 2007; Деркач и др., 2013; Shpakov, Derkach, 2013; Шпаков, Деркач, 2014).

Цель настоящего исследования состояла в изучении влияния длительного лечения метформином на активность АЦСС и NO-синтаз в миокарде и мозге крыс с ожирением, которое вызывали высокожировой диетой. Оценивали общую активность NO-синтазы, а также активность ее конститтивных изоформ — эндотелиальной (eNOS) и нейрональной (nNOS). Конститтивные изоформы постоянно присутствуют в большинстве тканей, включая миокард и ткани мозга, регулируются гормонами, а для их активности требуется ряд кофакторов ( $\text{Ca}^{2+}$ /кальмодулин и др.). Функциональную активность АЦСС в мембранах миокарда и синаптосом крыс оценивали по ее ответу на действиеmonoаминов, пептидных гормонов, агонистов  $\beta$ -адренергических рецепторов и релаксина, контролирующих вазодилатацию. Необходимо отметить, что чувствительная к гормонам АЦСС включает в себя три основных компонента — гормональный receptor серпантинного типа, гетеротримерный G-белок стимулирующего ( $G_s$ ) или ингибирующего ( $G_i$ ), типа и фермент аденилатциклазу (АЦ), каждый из которых может менять свою активность в условиях метаболических нарушений при ожирении.

## Материал и методика

Использовали 5-месячных самцов крыс Wistar, которые сначала были разделены на контрольную ( $n = 12$ ) и экспериментальную ( $n = 12$ ) группы. Крысы контрольной группы находились на стандартном рационе и не получали обогащенной жиром диеты. Крыс из экспериментальной группы (в дополнение к стандартному рациону) в течение 4 мес кормили свиным салом натощак из расчета 10–12 г на 1 кг массы тела. Через 2 мес контрольную группу разделили на две одинаковые подгруппы — контрольную (К) и контрольную, получающую метформин (К+МФ). Группу крыс с ожирением разделили на две подгруппы — ОЖ (без лечения) и ОЖ+МФ (с лечением

метформином). В каждой подгруппе было 6 крыс. Крыс групп К+МФ и ОЖ+МФ лечили метформином в течение 2 мес (Sigma-Aldrich, США) перорально, в суточной дозе 200 мг на 1 кг массы тела. Группы К и ОЖ все это время вместо метформина получали плацебо. По окончании эксперимента животных наркотизировали, подвергали декапитации и извлекали миокард и мозг для определения активности АЦ и NO-синтаз.

Для характеристики модели ожирения оценивали массу тела и количество накопленного абдоминального и эпидидимального жира. Для оценки толерантности к глюкозе использовали глюкозотolerантный тест (ГТТ), для чего крысам внутрибрюшинно вводили раствор глюкозы (2 г/кг) и измеряли концентрацию глюкозы в крови в течение 120 мин. Измерение уровня глюкозы проводили в цельной крови, полученной из хвостовой вены крыс, используя тест-полоски One Touch Ultra (США) и глюкометр (Life Scan Johnson & Johnson, Дания). Концентрацию инсулина в сыворотке крови измеряли с помощью набора Rat Insulin ELISA (Mercodia AB, Швеция). Для оценки липидного статуса определяли концентрацию триглицеридов, общего холестерина и холестерина, связанного с липопротеидами низкой (Х-ЛПНП) и высокой (Х-ЛПВП) плотности, которые измеряли с помощью наборов фирмы Ольвекс Диагностикум (Россия).

Для биохимических экспериментов использовали следующие реагенты: креатинфосфат, креатинфосфориназа из мышц кролика, АТФ, цАМФ, форсколин, 5'-гуанилилимидодифосфат (GppNPr), (6R)-5,6,7,8-тетрагидробиоптерина дигидрохлорид (BH<sub>4</sub>), флавинмононуклеотид (FMN), флавинадениннуклеотид (FAD), NADPH, каталаза из печени быка (3940 ЕД/мг белка), кальмодулин, L-аргинин, EDTA, EGTA, дитиотреитол, изопротеренол, норадреналин, серотонин, дофамин, бромокриптин, релаксин, соматостатин, [4-[(2-(3-хлорофенил)-2-гидроксиэтил]амино]пропил]уксусной кислоты натриевая соль (BRL-37344), 5-[(2R)-2-[(2R)-2-(3-хлорофенил)-2-гидроксиэтил]амино]пропил]-1,3-бензодиоксол-2,2-дикарбоновой кислоты динатриевая соль (CL-316243), моноклональные антитела, специфичные к участку 1185—1205 eNOS и участку 251—270 nNOS (Sigma-Aldrich, США), а также N-[(1R)-1-[(4-хлорофенил)метил]-2-[4-циклогексил-4-(1Н-1,2,4-триазол-1-илметил)-1-пиперидинил]-2-оксоэтил]-1,2,3,4-тетрагидро-3-изохинолинкарбоксамид (THIQ) и 5-нонилокситриптамин (5-НОТ) (Tocris Cookson Ltd., Великобритания). Активность АЦ измеряли с помощью радиоизотопного метода, используя в качестве меченого субстрата [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]АТФ (ОАО Всерегиональное объединение Изотоп, Россия).

Фракции синаптосомных мембран из тканей мозга (коры больших полушарий, гипоталамуса, стриатума и гиппокампа) выделяли, как описано ранее (Shpakov et al., 2013). Ткани мозга гомогенизировали при помощи Политрона в охлажденном (4 °C) 50 мМ Tris-HCl-буфере (pH 7.4), содержащем 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 320 мМ сахараозы и коктейль ингибиторов протеаз (500 мкМ O-фенантролина, 2 мкМ пепстатина и 1 мМ фенилметилсульфонилфторида) (буфер А). Гомогенат центрифугировали (1000 g, 10 мин), осадок отбрасывали, супернатант повторно центрифугировали (9000 g, 20 мин), осадок ресуспендировали в буфере А без сахараозы и центрифугировали при 35 000 g в течение 10 мин. Фракции плазматических мембран из миокарда выделяли, как описано ранее (Shpakov et al., 2012). Желудочки отделяли от предсердий, жира и сердечных клапанов, промывали охлажденным физиоло-

гическим раствором, измельчали и гомогенизировали с помощью Политрона в 20 объемах охлажденного буфера А. Гомогенат центрифугировали (480 g, 10 мин), осадок отбрасывали, супернатант центрифугировали (27 500 g, 20 мин), полученный осадок ресуспендировали в буфере А без сахарозы и повторно центрифугировали в том же режиме.

Активность АЦ во фракциях мембран синаптосом и миокарда измеряли, как описано ранее (Shpakov et al., 2010). Для определения активности АЦ реакцию проводили в течение 12 мин при 37 °C в инкубационной смеси, которая содержала 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1 мМ цАМФ, 1 мМ АТФ, 37 кБк [α-<sup>32</sup>P]АТФ, 20 мМ креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы и 50—100 мкг мембранных белков. Активность АЦ выражали в пкмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг мембранных белка. Ингибирование активности АЦ оценивали по влиянию гормона на активность фермента, предварительно стимулированную форсколином (10<sup>-5</sup> М). Мембранные инкубировали в присутствии форсколина в течение 5 мин до добавления гормона.

Активность NO-синтазы определяли в гомогенатах тканей на основе реакции 1.5 NADPH + 0.5H<sup>+</sup> + 2O<sub>2</sub> + L-аргинин = 1.5 NADP + 2H<sub>2</sub>O + L-цитруллин + NO по описанному методу (Stuehr, Griffith, 1996). Для получения гомогенатов образцы тканей мозга или желудочков сердца гомогенизировали с помощью Политрона в охлажденном до 4 °C 25 мМ Tris-HCl-буфере (pH 7.8), содержащем 1 мМ EDTA, 1 мМ EGTA и ингибиторы протеиназ (в соотношении 10 : 1). Полученный гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и использовали для определения активности NO-синтазы. Реакционная смесь (конечный объем 2 мл) для определения общей активности NO-синтаз содержала 40 мМ Tris-HCl (pH 7.8), 3 мМ дитиотреитола, 0.85 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мкМ кальмодулина, 1 мМ L-аргинина, 4 мкМ FAD, 4 мкМ FMN, 4 мкМ BH<sub>4</sub>, 10 ЕД/мл каталазы и 0.1 мМ NADPH. Реакцию начинали добавлением гомогената (содержание белка 80—200 мкг) и проводили при 25 °C в течение 15 мин. Контролем служили пробы без L-аргинина. Скорость окисления NADPH при участии NO-синтаз определяли спектрофотометрически по снижению поглощения при длине волн 340 нм, используя коэффициент экстинкции 6.22 мМ<sup>-1</sup>/см<sup>-1</sup>. Активность фермента выражали в пкмоль NADP за 1 мин на 1 мг белка. Общую активность NO-синтаз определяли в отсутствие специфических антител. Активность eNOS и nNOS рассчитывали путем вычитания активности соответственно nNOS или eNOS (преинкубация гомогената 10 мин в присутствии соответствующих антител в разведении 1 : 1000) из общей активности фермента, измеренной в отсутствие антител.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием компьютерной программы ANOVA. Данные представлены в виде средних значений и их ошибки из нескольких независимых экспериментов. Различия между значениями активности АЦ в различных группах животных оценивали как достоверные при *P* < 0.05. Для оценки чувствительности к инсулину использовали индекс инсулиновой резистентности HOMA-IR, который рассчитывали по формуле (G · I)/22.5, где концентрация глюкозы натощак (G) выражена в ммоль/л, а концентрация инсулина натощак (I) — в мкМЕ/мл. Для оценки склонности к образованию атеросклеротических изменений в сосудах использовали индекс атерогенности, который рассчитывали по формуле [общий холестерин, ммоль/л]/[холестерин-ЛПВП, ммоль/л] – 1.

## Результаты

У крыс с ожирением (группа ОЖ) наблюдали повышение массы тела, массы эпидидимального и абдоминального жира, обеих почек, повышение уровня глюкозы натощак и индекса HOMA-IR, а также повышение уровня триглицеридов, общего холестерина, Х-ЛПНП, соотношения Х-ЛПНП/Х-ЛПВП и индекса атерогенности (табл. 1). У животных была нарушена толерантность к глюкозе, что выражалось в статистически значимом повышении уровня глюкозы через 60 и 120 мин после глюкозной нагрузки в ГТТ. У крыс с ожирением концентрация глюкозы через 60 и 120 мин составила 12.2 ± 1.6 и 7.6 ± 0.6 мМ соответственно, что достоверно выше контрольного значения (9.0 ± 0.9 и 5.4 ± 0.4 мМ соответственно), *P* = 2 · 10<sup>-3</sup> и 2 · 10<sup>-5</sup> в сравнении с контролем соответственно. Длительное лечение метформином крыс с ожирением приводило к снижению массы тела и жировой ткани, нормализации массы почек, а также к снижению уровней глюкозы и инсулина и рассчитанного на них основе индекса HOMA-IR. С помощью ГТТ было показано, что толерантность к глюкозе при лечении метформином (группа крыс ОЖ+МФ) в значительной степени восстанавливается: через 60 и 120 мин после нагрузки уровень глюкозы составил 10.1 ± 1.1 и 6.3 ± 0.9 мМ соответственно (*P* = 0.026 и 0.018 в сравнении с группой ОЖ). В группе ОЖ+МФ также снижалась уровень Х-ЛПНП, соотношение Х-ЛПНП/Х-ЛПВП и индекс атерогенности. Эти данные свидетельствуют в пользу частичного восстановления у леченных метформином крыс с ожирением толерантности к глюкозе, чувствительности тканей к инсулину и показателей липидного обмена. Следует отметить, что введение метформина здоровым крысам снижало массу тела и абдоминального жира, уровень Х-ЛПНП (достоверно при *P* < 0.05), но сравнительно слабо влияло на другие оцениваемые показатели (табл. 1).

Далее изучали базальную и стимулированную GppNH<sub>p</sub> (негидролизуемый аналог ГТФ, активатор G<sub>s</sub>-белков) и форсколином активность АЦ во фракциях плазматических мембран, выделенных из миокарда и тканей мозга крыс с ожирением, и влияние на них лечения метформином. Показано, что базальная активность АЦ в мембранных миокарда крыс с ожирением была выше, чем у контрольных животных (33.4 ± 1.3 против 31.4 ± 1.2 пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг белка, *P* = 0.020). Обработка метформином снижала базальную активность фермента как при ожирении, так и у здоровых животных — соответственно до 28.8 ± 0.9 (*P* = 9 · 10<sup>-5</sup> в сравнении с группой ОЖ) и 27.9 ± 1.7 пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг белка (*P* = 0.002 в сравнении с группой К). В миокарде крыс с ожирением прирост активности АЦ, вызываемый обработкой 10<sup>-5</sup> М GppNH<sub>p</sub>, был существенно ниже, чем в контроле (50.2 ± 2.1 против 55.5 ± 2.1 пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг белка, *P* = 0.0014). У леченных метформином животных он в значительной степени повышался (даже выше уровня в контроле) до 60.5 ± 2.6 пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг белка (*P* = 2 · 10<sup>-5</sup> в сравнении с группой ОЖ). Прирост активности АЦ при обработке мембран миокарда форсколином (10<sup>-5</sup> М) — активатором каталитического сайта фермента — в группах ОЖ и К не различался (121 ± 6 и 115 ± 18 пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг белка) и практически не менялся при обработке метформином. Таким образом, в миокарде крыс с ожирением наблюдали небольшое повышение базальной активности АЦ и снижение

Таблица 1

## Влияние 2-месячного лечения метформином на показатели тела и на метаболические показатели контрольных (К) крыс и крыс с ожирением (ОЖ)

Показатель	К	К+МФ	ОЖ	ОЖ+МФ
Масса тела, г	353 ± 13	328 ± 21 <sup>a</sup>	400 ± 17 <sup>b</sup>	366 ± 18 <sup>a</sup>
Эпидидимальный жир, г	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.3	2.6 ± 0.3 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.3 <sup>a</sup>
Абдоминальный жир, г	3.2 ± 0.4	2.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	6.1 ± 1.3 <sup>b</sup>	4.3 ± 0.7 <sup>a</sup>
Мозг, г	1.59 ± 0.07	1.54 ± 0.06	1.59 ± 0.05	1.56 ± 0.04
Сердце, г	0.98 ± 0.04	0.95 ± 0.06	1.02 ± 0.06	0.99 ± 0.04
Левая почка, г	0.94 ± 0.04	0.98 ± 0.04	1.04 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.96 ± 0.04 <sup>a</sup>
Правая почка, г	0.99 ± 0.03	0.97 ± 0.03	1.12 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.03 <sup>a</sup>
Глюкоза (натощак), мМ	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.3	5.4 ± 0.6 <sup>b</sup>	4.6 ± 0.4 <sup>a</sup>
Инсулин, мкМЕ/мл	5.6 ± 1.1	5.1 ± 0.5	6.4 ± 1.0	5.1 ± 1.0 <sup>a</sup>
HOMA-IR	1.01 ± 0.21	0.89 ± 0.04	1.53 ± 0.27 <sup>b</sup>	1.03 ± 0.16 <sup>a</sup>
Триглицериды, мМ	0.74 ± 0.07	0.64 ± 0.12	1.23 ± 0.14 <sup>b</sup>	1.11 ± 0.15
Общий холестерин, мМ	4.53 ± 0.32	4.35 ± 0.34	5.84 ± 0.32 <sup>b</sup>	5.44 ± 0.35
X-ЛПВП, мМ	2.71 ± 0.28	2.79 ± 0.26	2.50 ± 0.19	2.75 ± 0.24
X-ЛПНП, мМ	1.64 ± 0.06	1.43 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.69 ± 0.27 <sup>b</sup>	2.38 ± 0.19 <sup>a</sup>
Соотношение X-ЛПНП/Х-ЛПВП	0.61 ± 0.06	0.51 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.08 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.06 <sup>a</sup>
Индекс атерогенности	0.67	0.56	1.34	0.98

Примечание. Во всех группах  $n = 6$ . Все показатели соответствуют 120 сут эксперимента. Группы К и ОЖ вместо МФ получали плацебо.

<sup>a</sup> Различия между группами К и К+МФ и между группами ОЖ и ОЖ+МФ достоверны при  $P < 0.05$ . <sup>b</sup> Различия между группами К и ОЖ достоверны при  $P < 0.05$ .

Таблица 2

## Прирост активности АЦ, вызванный гормональными агентами, в миокарде здоровых (К) крыс и крыс с ожирением (ОЖ) без лечения и с лечением метформином (+МФ)

Группа животных	Вызванный гормоном прирост активности АЦ над ее базальным уровнем, пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг белка, $M \pm SD$				
	изопротеренол, $10^{-5}$ М	норадреналин, $10^{-5}$ М	CL-316243, $10^{-5}$ М	BRL-37344, $10^{-5}$ М	релаксин, $10^{-8}$ М
К	69.2 ± 2.1	65.7 ± 2.6	15.7 ± 1.0	17.7 ± 2.0	55.0 ± 1.8
К+МФ	74.7 ± 5.9	70.8 ± 5.2	16.8 ± 1.6	20.0 ± 1.9	52.5 ± 2.5
ОЖ	56.0 ± 4.5 <sup>a</sup>	51.2 ± 3.9 <sup>a</sup>	19.8 ± 2.1 <sup>a</sup>	23.2 ± 1.7 <sup>a</sup>	41.3 ± 2.3 <sup>a</sup>
ОЖ+МФ	67.5 ± 3.6 <sup>b</sup>	65.3 ± 2.9 <sup>b</sup>	16.5 ± 1.4 <sup>b</sup>	18.7 ± 2.6 <sup>b</sup>	44.5 ± 3.6

Примечание. <sup>a</sup> Различия между группами К и ОЖ достоверны при  $P < 0.05$ . <sup>b</sup> Различия между группами К и К+МФ и между группами ОЖ и ОЖ+МФ достоверны при  $P < 0.05$ .

Таблица 3

## Прирост активности аденилатциклизазы (АЦ), вызванный гормонами, в мозге здоровых крыс и крыс с ожирением и влияние на него длительной обработки метформином

Группа животных	Вызванный гормоном прирост активности АЦ над ее базальным уровнем, пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг белка, $M \pm SD$					
	серотонин, $10^{-5}$ М	дофамин, $10^{-5}$ М	норадреналин, $10^{-5}$ М	релаксин, $10^{-8}$ М	$\alpha$ -МСГ, $10^{-7}$ М	THIQ, $10^{-7}$ М
К	86.8 ± 2.1	46.8 ± 1.5	34.5 ± 2.2	39.5 ± 1.9	40.7 ± 3.3	26.0 ± 2.4
К+МФ	80.8 ± 2.3 <sup>a</sup>	52.5 ± 3.9 <sup>a</sup>	38.2 ± 2.3 <sup>a</sup>	36.7 ± 3.3	38.8 ± 1.7	25.3 ± 2.3
ОЖ	77.7 ± 1.6 <sup>b</sup>	44.0 ± 3.0	31.3 ± 3.0	33.8 ± 1.5 <sup>b</sup>	29.8 ± 3.0 <sup>b</sup>	14.8 ± 1.5 <sup>b</sup>
ОЖ+МФ	88.0 ± 2.7 <sup>a</sup>	47.7 ± 2.9	37.2 ± 1.5 <sup>a</sup>	35.2 ± 2.5	36.3 ± 2.8 <sup>a</sup>	22.5 ± 1.8 <sup>a</sup>

Примечание. <sup>a</sup> Различия между группами К и К+МФ и между группами ОЖ и ОЖ+МФ достоверны при  $P < 0.05$ . <sup>b</sup> Различия между группами К и ОЖ достоверны при  $P < 0.05$ .

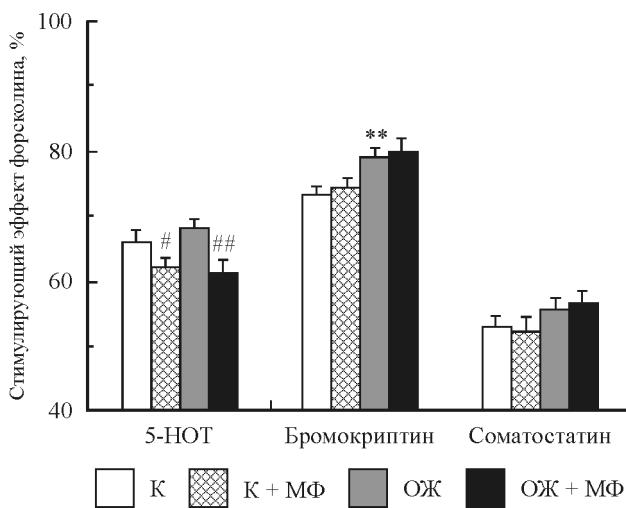


Рис. 1. Ингибиование гормонами аденилатциклазой (АЦ) активности, стимулированной форсколином, в мембранах синаптосом мозга контрольных крыс (К) и с ожирением (ОЖ), леченных метформином (+МФ).

Концентрация 5-НОТ и бромокриптина —  $10^{-5}$  М, соматостатина —  $10^{-6}$  М. Стимуляция АЦ форсколином ( $10^{-5}$  М) в отсутствие гормонов принята за 100 %. \*\*различия между группами К и ОЖ достоверны при  $P < 0.001$ , #, ##различия между группами К и К+МФ и между ОЖ и ОЖ+МФ достоверны при  $P < 0.05$  и  $P < 0.001$  соответственно.

стимуляции фермента гуаниновым нуклеотидом, причем лечение животных метформином восстанавливала эти показатели.

В синаптосомных мембранных, выделенных из мозга крыс с ожирением, базальная активность АЦ была ниже, чем в контроле ( $24.0 \pm 1.1$  против  $25.9 \pm 0.6$  пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг белка,  $P = 0.0042$ ), в то время как стимулирующие эффекты GppNHp и форсколина в группах ОЖ и К не различались. Лечение метформином слабо влияло как на базальную, так и на стимулированную негормональными агентами активность АЦ (данные не

представлены). Таким образом, в отличие от миокарда функциональная активность АЦС в мембранных синаптосом крыс с ожирением существенно не отличалась от та-ковой в контроле, исключая небольшое снижение базальной активности фермента, и не менялась при введении животным метформина.

На следующем этапе изучали стимуляцию АЦ в миокарде агонистами  $\beta$ -адренергических рецепторов и релаксином, которые контролируют сердечный ритм и вазодилатацию. У крыс с ожирением было снижено стимулирующее действие изопротеренола и норадреналина, действие которых осуществляется преимущественно через адренорецепторы  $\beta_1$  и  $\beta_2$ , и, напротив, повышенено действие BRL-37344- и CL-316243-селективных агонистов  $\beta_3$ -адренорецепторов (табл. 2). Это указывает на то, что при ожирении соотношение путей, стимулирующих АЦ в миокарде, претерпевает изменения: сигнализация адренорецепторов типа  $\beta_1/\beta_2$  ослабляется, а  $\beta_3$  — усиливается. Наряду с этим в миокарде крыс с ожирением существенно (на 25 %) снижается стимулирующее действие пептидного гормона релаксина, действующего через  $G_s$ -сопряженный релаксиновый receptor RXFP1. Длительное лечение метформином практически полностью восстанавливало регуляцию АЦ адренергическими агонистами и нормализовало соотношение сигналных путей  $\beta$ -адренергических рецепторов, но слабо влияло на действие релаксина. Следует отметить, что обработка метформином здоровых крыс вызывала усиление сигнализации  $\beta$ -адренорецепторов, хотя и незначительное по величине, но не изменяла соотношения их сигналных путей (табл. 2). Полученные данные указывают на то, что одним из механизмов кардиопротекторного действия метформина в условиях ожирения является его способность сохранять функциональную активность адренорецепторов типов  $\beta_1$  и  $\beta_2$  и предотвращать гиперактивацию рецепторов типа  $\beta_3$ , которая является компенсаторной реакцией на ослабление сигнализации  $\beta_1/\beta_2$ -рецепторов.

В мозге крыс с ожирением были снижены, хотя и в различной степени, стимулирующие эффекты серотони-

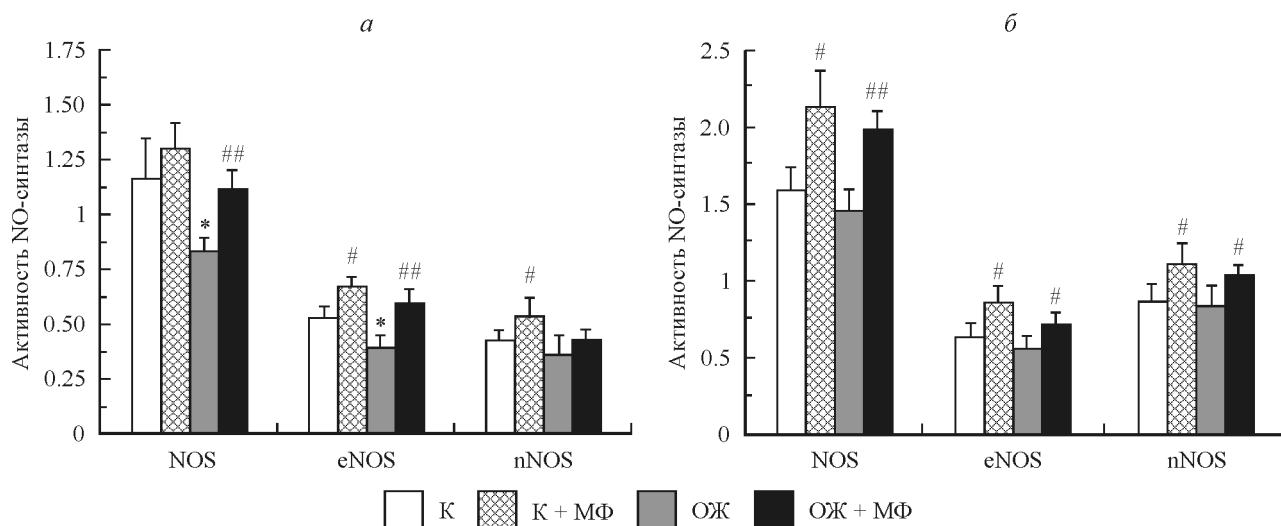


Рис. 2. Влияние длительного лечения метформином (МФ) на общую активность NO-синтаз (NOS) и на активность изоформ eNOS и nNOS в миокарде (а) и в мозге (б) здоровых крыс и при ожирении.

Активность ферментов выражена в пкмоль NADP за 1 мин на 1 мг белка. К и ОЖ — крысы контрольные и с ожирением соответственно, не получавшие МФ; К+МФ и ОЖ+МФ — крысы, получавшие МФ. а — \*различия между группами К и ОЖ достоверны при  $P < 0.05$ , #, ##различия между группами К и К+МФ и между группами ОЖ и ОЖ+МФ достоверны при  $P < 0.05$  и  $P < 0.001$  соответственно; б — #, ##различия между группами К и К+МФ и между группами ОЖ и ОЖ+МФ достоверны при  $P < 0.05$  и  $P < 0.001$  соответственно.

на, релаксина,  $\alpha$ -меланоцитстимулирующего гормона и THIQ (табл. 3). Так, эффекты  $\alpha$ -меланоцитстимулирующего гормона и THIQ (соответственно неселективного и селективного агонистов меланокортиковых рецепторов 4-го типа) снижались на 27 и 43 %, что свидетельствует в пользу значительного ослабления меланокортиковых сигнальных путей в мозге при ожирении. Лечение крыс с ожирением метформином восстанавливало регуляцию АЦ серотонином и агонистами меланокортиковых рецепторов и усиливало стимулирующее влияние норадреналина на активность АЦ. Сходное влияние обработки метформином на действие норадреналина наблюдали и в группе крыс К+МФ (табл. 3). При изучении ингибирующего влияния гормонов на активность АЦ, которое оценивали по снижению стимулирующего действия форсколина, было показано, что в условиях ожирения ослабляется ингибирующий эффект бромокриптина — агониста дофаминовых рецепторов 2-го типа ( $P = 10^{-4}$  в сравнении с группой К), причем лечение метформином его не восстанавливало. При обработке метформином в обеих группах (ОЖ+МФ и К+МФ) усиливалось ингибирующее действие 5-HT — агониста G<sub>i</sub>-сопряженных серотониновых рецепторов 1B-подтипа (рис. 1).

На заключительном этапе изучали активность NO-синтаз в миокарде и мозге крыс с ожирением и влияние на нее лечения метформином. В миокарде крысы с ожирением в сравнении с группой К снижались общая активность NO-синтаз (на 28 %,  $P = 0.0024$ ) и активность eNOS (на 26 %,  $P = 0.0013$ ), в то время как активность nNOS не изменялась. Лечение метформином крыс с ожирением приводило к полному восстановлению общей активности NO-синтаз. Необходимо отметить, что обработка метформином здоровых животных вызывала повышение активности NO-синтаз в миокарде, причем в случае конститутивных изоформ фермента различия с группой К были статистически значимыми (рис. 2, а). В мозге статистически значимых различий активности NO-синтаз между группами К и ОЖ не было, но обработка метформином отчетливо повышала активность ферментов как у крыс с ожирением, так и у здоровых животных (рис. 2, б). Таким образом, длительное лечение метформином не только восстанавливает сниженную в условиях ожирения активность NO-синтаз в миокарде, но и повышает активность фермента в миокарде и мозге выше ее уровня в контроле.

## Обсуждение

Нами показано, что длительное лечение метформином крыс с ожирением снижает массу тела и жировой ткани животных, улучшает толерантность к глюкозе, снижает уровни глюкозы и инсулина и, как следствие, индекс инсулиновой резистентности, а также уровни общего холестерина, Х-ЛПНП, соотношения Х-ЛПНП/Х-ЛПВП и индекса атерогенности, в значительной степени повышенных в условиях ожирения. В то же время метформин сравнительно слабо влиял на уровни триглицеридов и Х-ЛПВП. Полученные нами данные хорошо согласуются с результатами клинических исследований, в которых показано, что лечение метформином пациентов с метаболическим синдромом и СД 2-го типа улучшает гликемический контроль, повышает чувствительность тканей к инсулину, снижает уровень атерогенных форм холестерина и в меньшей степени триглицеридов, но при этом почти не влияет на уровень Х-ЛПВП (Wulffele et al.,

2004). Вызываемое метформином восстановление углеводного и липидного метаболизма влечет за собой ослабление окислительного стресса и предотвращает развитие стресса эндоплазматического ретикулума, что в конечном итоге приводит к восстановлению ряда физиологических и биохимических процессов. В пользу этого свидетельствуют полученные нами данные о восстановлении активности АЦСС и NO-синтаз у крыс с ожирением при их лечении метформином.

Так, нами впервые показано, что длительная обработка метформином улучшает функциональную активность АЦСС и ее чувствительность к гормонам в мозге и миокарде крыс с экспериментальной моделью ожирения. Основными причинами этого, как отмечалось выше, являются улучшение метаболических показателей и ослабление окислительного стресса, негативно влияющего на сигнальную трансдукцию. Однако нельзя исключить и непосредственное влияние метформина на активность АЦСС и нижележащих цАМФ-зависимых эффекторных белков. В пользу этого свидетельствуют данные ряда авторов о способности метформина и его функционального и структурного аналога фенформина ингибировать стимуляцию АЦ глюкагоном в гепатоцитах (Alengrin et al., 1987; Gawler et al., 1989; Yu et al., 1994; Hardie, 2013; Miller et al., 2013). Это ведет к подавлению продукции глюкозы печенью и снижению гипергликемии и лежит в основе сахароснижающего действия бигуанидов. Однако молекулярные механизмы ингибирующего влияния метформина и фенформина на передачу глюкагонового сигнала через АЦ-систему до конца не выяснены.

Показано, что бигуаниды не влияют на receptor глюкагона и G<sub>s</sub>-белок, поскольку ингибируют повышение уровня цАМФ, вызываемое только форсколином, который взаимодействует с каталитическим компонентом АЦ-системы, расположенным ниже рецептора и G<sub>s</sub>-белка. Фармакологическими методами показано, что бигуаниды не влияют на активность цАМФ-зависимой фосфодиэстеразы, которая вместе с АЦ контролирует внутриклеточную концентрацию цАМФ (Miller et al., 2013). Они слабо влияют на активацию цАМФ- зависимых транскрипционных факторов, вызываемую дигуанил-циАМФ (функциональным аналогом цАМФ), который способен проникать через плазматическую мембрану внутрь клетки. На основании этого был сделан вывод об ингибирующем влиянии бигуанидов непосредственно на АЦ. В этом процессе ключевую роль играет АМФ, уровень которого в клетке при обработке бигуанидами в значительной степени повышается.

АМФ связывается с ингибиторным сайтом АЦ (Р-сайтом) и ингибирует каталитическую активность фермента. Обработка клеток метформином также вызывает снижение уровня АТФ, основного субстрата АЦ, что ведет к ингибированию функциональной активности фермента (Foretz et al., 2010). Снижение концентрации АТФ и повышение уровня АМФ связано со способностью метформина и других бигуанидов активировать 5'-АМФ-активируемую протеинкиназу (Zhou et al., 2001). Однако имеются данные о том, что вызываемые бигуанидами изменения концентрации АТФ и АМФ могут осуществляться и по независимым от этой протеинкиназы сигнальным путям (Foretz et al., 2010; Rena et al., 2013). Так, показано, что фенформин сохраняет способность подавлять стимуляцию АЦ глюкагоном в гепатоцитах, дефицитных по гену, кодирующему 5'-АМФ-активируемую протеинкиназу (Miller et al., 2013).

Следует, однако, отметить, что недавно появились данные о том, что мишениями действия метформина могут быть и начальные звенья АЦСС — receptor и G<sub>s</sub>-белок. Показано, что метформин ( $10^{-7}$  М) в культуре гранулезных клеток яичников человека ослабляет влияние фолликулостимулирующего гормона на экспрессию гена, кодирующего фермент ароматазу, которая превращает тестостерон в эстрадиол, причем действие гормона реализуется через сигнальный каскад, включающий в себя его receptor, G<sub>s</sub>-белок, АЦ, ПК-А и цАМФ-зависимый транскрипционный фактор CREB (cAMP response element binding protein) (Rice et al., 2013). Поскольку метформин не влиял на стимуляцию экспрессии ароматазы форсколином, было сделано предположение о том, что мишени его действия расположены выше фермента АЦ, на уровне receptorа ФСГ и сопряженного с ним G<sub>s</sub>-белка. Возможно, в этом случае проявляется тканевая и receptorная специфичность молекулярных механизмов действия метформина на АЦСС.

Полученные нами данные указывают на восстановление сигнализации  $\beta$ -адренорецепторов в миокарде крыс с ожирением, получавших метформин, на что указывают усиление стимуляции АЦ агонистами  $\beta_1$ - и  $\beta_2$ -адренорецепторов, ослабленной при ожирении, и нормализующее действие агонистов  $\beta_3$ -адренорецепторов, которые в группе ОЖ были, напротив, активированы. Другие авторы отмечали, что при ожирении, метаболическом синдроме и СД 2-го типа вследствие повышения уровня катехоламинов в миокарде меняется соотношение сигнальных путей, реализуемых через различные типы  $\beta$ -адренорецепторов, что является одной из причин сердечной недостаточности и диабетической кардиомиопатии (Moniotte et al., 2001; Rozec, Gauthier, 2006). При этом наблюдается значительное повышение числа  $\beta_3$ -рецепторов и снижение числа  $\beta_1$ -рецепторов.

Показано, что у пациентов с СД 2-го типа и метаболическим синдромом в гене  $\beta_3$ -адренорецептора выявлена мутация в кодоне 64 (замена остатка триптофана на аргинин), которая повышает активность receptorа (Walston et al., 1995; Sakane et al., 1998). Имеются данные о том, что лечение метформином крыс с гипергликемией и инсулиновой резистентностью вызывает повышение чувствительности клеток сосудов к действию норадреналина, хотя регуляция метформином цАМФ- зависимых сигнальных каскадов авторами не изучалась (Lobato et al., 2012). Поскольку развивающаяся в условиях длительной гипергликемии резистентность гладкомышечных клеток сосудов и миокарда к норадреналину и следующее за этим компенсаторное повышение уровня гормона являются основными причинами дисбаланса  $\beta$ -адренорецепторов при метаболическом синдроме и СД 2-го типа, вызываемое метформином повышение чувствительности к норадреналину должно приводить к восстановлению нормального соотношения между адренорецепторами  $\beta_1/\beta_2$  и  $\beta_3$ . Нами показано, что обработка метформином вызывает усиление стимуляции АЦ норадреналином в тканях мозга, причем этот эффект отмечался как у крыс с ожирением, так и у здоровых животных, что указывает на способность метформина восстанавливать адренергическую регуляцию и зависимую от нее циркуляцию крови как в миокарде, так и в других тканях.

В мозге крыс с ожирением, получавших метформин, отмечали восстановление меланокортиковых сигнальных путей, которые играют ключевую роль в повышении чувствительности периферических тканей к инсулину и в

нормализации энергетического обмена, нарушенного в условиях ожирения и метаболического синдрома. Показано, что выключение меланокортиковых receptorов 4-го типа или ослабление передачи через них гормональных сигналов приводит к гиперфагии, ожирению, дислипидемии, в то время как восстановление активности этих receptorов, напротив, нормализует пищевое поведение и метаболические показатели (Fan et al., 2000; Obici et al., 2001; Balthasar et al., 2005; Nogueiras et al., 2007). Вследствие этого обнаруженное нами восстановление регуляции АЦ агонистами меланокортикового receptorа 4-го типа является одним из механизмов терапевтического эффекта метформина в условиях ожирения и других метаболических расстройств. В свою очередь вызываемое метформином усиление функциональной активности G<sub>i</sub>-сопряженных серотониновых receptorов 1B-подтипа может вносить существенный вклад в улучшение функционирования сердечно-сосудистой и нервной систем, поскольку роль этого receptorа в их регуляции в настоящее время является доказанной (Villalón, Centurión, 2007; Drago et al., 2010). Установлено также, что серотониновые receptorы 1B-подтипа вовлечены в контроль массы тела, пищевого поведения и липидного обмена опосредованно, через регуляцию меланокортиковых receptorов 4-го типа, с которыми они ко-локализованы в гипоталамических нейронах (Garfield, Heisler, 2009; Lam et al., 2010; Doslikova et al., 2013). Поскольку меланокортиковые и серотониновые системы мозга, а также функционально связанные с ними нейромедиаторные системы вовлечены в контроль нейрогенеза, а нарушения в них ведут к запуску нейродегенеративных процессов (Shpakov et al., 2011; Шпаков, Деркач, 2012), их восстановление является одним из механизмов нейропротекторного эффекта, присущего метформину и другим бигуанидам.

Важнейшими мишениями действия метформина являются NO-синтазные сигнальные каскады, нарушенные в условиях ожирения и диабетической патологии (Anfossi et al., 2002; Sartoreto et al., 2005; Davis et al., 2006; Rattigan et al., 2007; Davel et al., 2011), что подтвердили и наши результаты. При лечении метформином крыс с ожирением наблюдали не только восстановление общей активности NO-синтаз и активности конститутивных изоформ фермента в миокарде и мозге, но и усиление активности NO-синтаз у здоровых животных. При этом в мозге общая активность NO-синтаз в группе ОЖ+МФ даже превышала таковую в контроле.

В пользу стимулирующего влияния метформина на активность NO-синтаз свидетельствуют и данные других авторов. Повышение активности NO-синтаз может быть вызвано активацией регулирующих NO-синтазы сигнальных каскадов или снижением уровня асимметричного диметиларгинина, ингибирующего активность фермента. Показано, что обработка спонтанно гипертензивных крыс метформином в дозе 500 мг/кг в течение 8 нед приводила к значительному снижению у них уровня асимметричного диметиларгинина и повышению продукции NO и, как следствие, предотвращала повышение артериального давления (Tsai et al., 2014). Обработка крыс метформином в дозах от 200 до 300 мг/кг повышала выживаемость кожных лоскутов через повышение активности NO-синтазы (Taleb et al., 2014). Совместное применение метформина и L-аргинина, основного субстрата NO-синтаз, повышало эффективность действия метформина, причем в этом случае метформин стимулировал продукцию NO, действуя в более низких концентрациях (Taleb et al.,

2014). Среди других механизмов стимулирующего влияния метформина на активность NO-синтаз необходимо отметить его выраженный антиоксидантный эффект, а также ингибирующее влияние на протекание воспалительных процессов (Davel et al., 2011; Zhu et al., 2014).

Усиление окислительного стресса в условиях ожирения и метаболического синдрома приводит к ускорению метаболизма NO, что снижает его концентрацию в клетках эндотелия (Feletou, Vanhoutte, 2006). В этой связи следует подчеркнуть, что антиоксидантный эффект метформина описан многими исследователями (Gallo et al., 2005; Ouslimani et al., 2005; Mahrouf et al., 2006). В пользу противовоспалительного эффекта метформина свидетельствуют данные о снижении активности транскрипционного фактора NF-кБ и провоспалительных цитокинов — фактора некроза опухолей, интерлейкинов 1 $\beta$  и 6 в мозге крыс линии Sprague-Dawley с генетически обусловленным ожирением, которым в течение 3 нед вводили метформином в суточной дозе 50 мг/кг (Zhu et al., 2014). При этом авторы отмечают значимое повышение активности NO-синтаз в тканях мозга, что улучшало циркуляцию крови и препятствовало развитию экспериментальной ишемии.

Таким образом, нами впервые изучено влияние длительного действия метформина на крыс с ожирением, вызванным высокожировой диетой, и показано, что оно приводит к восстановлению у них толерантности к глюкозе, чувствительности тканей к инсулину и показателей липидного обмена. В миокарде и мозге крыс, леченных метформином, частично или полностью восстанавливаясь чувствительность АЦСС к регуляторному действию гормонов. В миокарде нормализовалось соотношение между каскадами, стимулирующими АЦ, осуществлямыми через  $\beta_1/\beta_2$ - и  $\beta_3$ -адренорецепторы. В мозге крыс с ожирением восстанавливались сигнальные пути регуляции АЦСС, зависимые от меланокортиновых (4-го типа) и серотониновых (6-го типа) рецепторов, ответственных за контроль функций ЦНС и периферического энергетического гомеостаза. Обработка метформином также приводила к восстановлению в миокарде общей активности NO-синтаз и активности эндотелиальной NO-синтазы, сниженных при ожирении. Установлено, что у здоровых животных метформин приводит к гиперактивации NO-синтаз в мозге и миокарде животных, что свидетельствует о стимуляции им NO-синтазных сигнальных путей. Сделан вывод о том, что повышение чувствительности тканей к инсулину, нормализация регуляции АЦСС адренергическими агонистами в миокарде, восстановление серотониновой и меланокортиновой сигнализации в мозге, а также восстановление активности NO-синтаз в миокарде крыс с ожирением при длительном лечении их метформином могут лежать в основе кардио- и нейропротекторного действия этого препарата.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00413).

#### Список литературы

Деркач К. В., Шпаков А. О., Мойсеюк И. В., Чистякова О. В. 2013. Функциональная активность аденилатциклазной сигнальной системы в мозге, миокарде и семенниках крыс с 8-и 18-месячным неонатальным диабетом. Докл. РАН. 448 (5) : 598—601. (Derkach K. V., Shpakov A. O., Moyseuk I. V., Chistyakova O. V. 2013. The functional activity of adenylyl cyclase signa-

ling system in the brain, myocardium, and testes of rats with 8- and 18-month neonatal diabetes. Dokl. Biochem. Biophys. 448 : 43—45.)

Шпаков А. О., Деркач К. В. 2012. Пептидергические сигнальные системы мозга при сахарном диабете. Цитология. 54 (10) : 733—741. (Shpakov A. O., Derkach K. V. 2013. Peptidergic signaling brain systems in diabetes mellitus. Cell Tissue Biol. (Cytobiologia). 7 (3) : 212—220.)

Шпаков А. О., Деркач К. В. 2014. Функционирование гормончувствительной аденилатциклазной сигнальной системы в периферических тканях при сахарном диабете. Цитология. 56 (2) : 91—104. (Shpakov A. O., Derkach K. V. 2014. Functioning of hormone-sensitive adenylyl cyclase signaling system in the peripheral tissues in diabetes mellitus. Cytobiologia. 56 (2) : 91—104.)

Шпаков А. О., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Бондарева В. М., Гурьянов И. А., Власов Г. П., Перцева М. Н. 2006. Снижение функциональной активности G-белков, компонентов гормончувствительной аденилатциклазной сигнальной системы, при экспериментальном диабете 2-го типа. Бюл. эксперим. биол. мед. 142 (12) : 641—645. (Shpakov A. O., Kuznetsova L. A., Plesneva S. A., Bondareva V. M., Guryanov I. A., Vlasov G. P., Pertseva M. N. 2006. Decrease in functional activity of G-proteins hormone-sensitive adenylate cyclase signaling system, during experimental type II diabetes mellitus. Bull. Exp. Biol. Med. 142 : 685—689.)

Alengrin F., Grossi G., Canivet B., Dolais-Kitabgi J. 1987. Inhibitory effects of metformin on insulin and glucagon action in rat hepatocytes involve post-receptor alterations. Diabetes Metab. 13 : 591—597.

Anfossi G., Massucco P., Mattiello L., Balbo A., Russo I., Doronzo G., Rolle L., Ghigo D., Fontana D., Bosia A., Trovati M. 2002. Insulin influences the nitric oxide cyclic nucleotide pathway in cultured human smooth muscle cells from corpus cavernosum by rapidly activating a constitutive nitric oxide synthase. Eur. J. Endocrinol. 147 : 689—700.

Bailey C. J. 2008. Metformin: effects on micro and macrovascular complications in type 2 diabetes Cardiovasc. Drugs Ther. 22 : 215—224.

Balthasar N., Dalgaard L. T., Lee C. E., Yu J., Funahashi H., Williams T., Ferreira M., Tang V., McGovern R. A., Kenny C. D., Christiansen L. M., Edelstein E., Choi B., Boss O., Aschkenasi C., Zhang C. Y., Mountjoy K., Kishi T., Elmquist J. K., Lowell B. B. 2005. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. Cell. 123 : 493—505.

Davel A. P., Wenceslau C. F., Akamine E. H., Xavier F. E., Couto G. K., Oliveira H. T., Rossoni L. V. 2011. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. Braz. J. Med. Biol. Res. 44 : 920—932.

Davis B. J., Xie Z., Viollet B., Zou M. H. 2006. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. Diabetes. 55 : 496—505.

Diabetes Prevention Program Research Group. 2002. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin N. Engl. J. Med. 346 : 393—403.

Doslikova B., Garfield A. S., Shaw J., Evans M. L., Burdakov D., Billups B., Heisler L. K. 2013. 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist anorectic efficacy potentiated by 5-HT1B receptor agonist coapplication: an effect mediated via increased proportion of pro-opiomelanocortin neurons activated. J. Neurosci. 33 : 9800—9804.

Drago A., Alboni S., Brunello N., De Ronchi D., Serretti A. 2010. 5-HT<sub>1B</sub> as a risk profile maker in psychiatric disorders: a review through motivation and memory. Eur. J. Clin. Pharmacol. 66 : 5—27.

Fan W., Dinulescu D. M., Butler A. A., Zhou J., Marks D. L., Cone R. D. 2000. The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels. Endocrinology. 141 : 3072—3079.

Feletou M., Vanhoutte P. M. 2006. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (the Wiggers Award lecture). Amer. J. Physiol. 291 : 985—1002.

Foretz M., Hébrard S., Leclerc J., Zarrinpashteh E., Soty M., Mithieux G., Sakamoto K., Andreelli F., Viollet B. 2010. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the

- LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J. Clin. Invest.* 120 : 2355—2369.
- Gallo A., Ceolotto G., Pinton P., Iori E., Murphy E., Rutter G. A., Rizzuto R., Semplicini A., Avogaro A. 2005. Metformin prevents glucose-induced protein kinase C-beta2 activation in human umbilical vein endothelial cells through an antioxidant mechanism. *Diabetes*. 54 : 1123—1131.
- Garfield A. S., Heisler L. K. 2009. Pharmacological targeting of the serotonergic system for the treatment of obesity. *J. Physiol.* 587 : 49—60.
- Gawler D. J., Wilson A., Houslay M. D. 1989. Metformin treatment of lean and obese Zucker rats modulates the ability of glucagon and insulin to regulate hepatocyte adenylate cyclase activity. *J. Endocrinol.* 122 : 207—212.
- Grant P. J. 2003. Beneficial effects of metformin on haemostasis and vascular function in man. *Diabetes Metab.* 29 : 44—52.
- Hardie D. G. 2013. Metformin-acting through cyclic AMP as well as AMP? *Cell. Metab.* 17 : 313—314.
- Lam D. D., Garfield A. S., Marston O. J., Shaw J., Heisler L. K. 2010. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97 : 84—91.
- Leverte X. M., Guigas B., Detaille D., Batandier C., Koceir E. A., Chauvin C., Fontaine E., Wiernsperger N. F. 2003. Mitochondrial metabolism and type-2 diabetes: a specific target of metformin. *Diabetes Metab.* 29 : 88—94.
- Lobato N. S., Filgueira F. P., Hagihara G. N., Akamine E. H., Pariz J. R., Tostes R. C., Carvalho M. H., Fortes Z. B. 2012. Improvement of metabolic parameters and vascular function by metformin in obese non-diabetic rats. *Life Sci.* 90 : 228—235.
- Mahrouf M., Ouslimani N., Peynet J., Djelidi R., Couturier M., Therond P., Legrand A., Beaudeux J. L. 2006. Metformin reduces angiotensin-mediated intracellular production of reactive oxygen species in endothelial cells through the inhibition of protein kinase C. *Biochem. Pharmacol.* 72 : 176—183.
- Miller R. A., Chu Q., Xie J., Foretz M., Viollet B., Birnbaum M. J. 2013. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature*. 494 : 256—260.
- Moniotte S., Kobzik L., Feron O., Trochu J. N., Gauthier C., Balligand J. L. 2001. Upregulation of  $\beta_3$ -adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation*. 103 : 1649—1655.
- Nathan D. M., Buse J. B., Davidson M. B., Heine R. J., Holman R. R., Sherwin R., Zinman B. 2006. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. *Diabetes Care*. 29 : 1963—1972.
- Nogueiras R., Wiedmer P., Perez-Tilve D., Veyrat-Durebex C., Keogh J. M., Sutton G. M., Pfluger P. T., Castanada T. R., Neischen S., Hofmann S. M. 2007. The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* 117 : 3475—3488.
- Obici S., Feng Z., Tan J., Liu L., Karkanias G., Rossetti L. 2001. Central melanocortin receptors regulate insulin action. *J. Clin. Invest.* 108 : 1079—1085.
- Ouslimani N., Peynet J., Bonnefont-Rousselot D., Therond P., Legrand A., Beaudeux J. L. 2005. Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism*. 54 : 829—834.
- Rattigan S., Bussey C. T., Ross R. M., Richards S. M. 2007. Obesity, insulin resistance, and capillary recruitment. *Microcirculation*. 14 : 299—309.
- Rena G., Pearson E. R., Sakamoto K. 2013. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia*. 56 : 1898—1906.
- Rice S., Elia A., Jawad Z., Pellatt L., Mason H. D. 2013. Metformin inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action in human granulosa cells: relevance to polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98 : 1491—1500.
- Rozec B., Gauthier C. 2006.  $\beta_3$ -adrenoceptors in the cardiovascular system: putative roles in human pathologies. *Pharmacol. Ther.* 111 : 652—673.
- Sakane N., Yoshida T., Yoshioka K., Nakamura Y., Umekawa T., Kogure A., Takakura Y., Kondo M. 1998. Trp<sup>64</sup>Arg mutation of  $\beta_3$ -adrenoceptor gene is associated with diabetic nephropathy in Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*. 41 : 1533—1534.
- Sartoretto J. L., Melo G. A., Carvalho M. H., Nigro D., Pasaglia R. T., Scavone C., Cuman R. K., Fortes Z. B. 2005. Metformin treatment restores the altered microvascular reactivity in neonatal streptozotocin-induced diabetic rats increasing NOS activity, but not NOS expression. *Life Sci.* 77 : 2676—2689.
- Shpakov A., Chistyakova O., Derkach K., Bondareva V. 2011. Hormonal signaling systems of the brain in diabetes mellitus. In: *Neurodegenerative diseases — processes, prevention, protection and monitoring*. Ed. R. C. C. Chang. Rijeka, Croatia: Intech Open Access Publ. 349—386. DOI: 10.5772/28930.
- Shpakov A. O., Chistyakova O. V., Derkach K. V., Moiseyuk I. V., Bondareva V. M. 2012. Intranasal insulin affects adenylyl cyclase system in rat tissues in neonatal diabetes. *Central Eur. J. Biol.* 7 : 33—47.
- Shpakov A. O., Derkach K. V. 2013. The functional state of hormone-sensitive adenylyl cyclase signaling system in diabetes mellitus. *J. Signal Transduction*. 2013 : 594213. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/594213>.
- Shpakov A., Derkach K., Moiseyuk I., Chistyakova O. 2013. Alterations of hormone-sensitive adenylyl cyclase system in the tissues of rats with long-term streptozotocin diabetes and the influence of intranasal insulin. *Dataset Papers in Pharmacol.* 2013 : 698435. <http://dx.doi.org/10.7167/2013/698435>.
- Shpakov A. O., Shpakova E. A., Tarasenko I. I., Derkach K. V., Vlasov G. P. 2010. The peptides mimicking the third intracellular loop of 5-hydroxytryptamine receptors of the types 1B and 6 selectively activate G proteins and receptor-specifically inhibit serotonin signaling via the adenylyl cyclase system. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 16 : 95—105.
- Stuehr D. J., Griffith O. W. 1996. Purification, assay and properties of mammalian nitric oxide synthases. In: *Methods in nitric oxide research*. Eds M. Feelisch, J. S. Stamler. Chichester: John Wiley&Sons Inc. 177—186.
- Taleb S., Moghaddas P., Rahimi Balaei M., Taleb S., Rahimpour S., Abbasi A., Ejtemaei-Mehr S., Dehpour A. R. 2014. Metformin improves skin flap survival through nitric oxide system. *J. Surg. Res.* 192 : 686—691.
- Tsai C. M., Kuo H. C., Hsu C. N., Huang L. T., Tain Y. L. 2014. Metformin reduces asymmetric dimethylarginine and prevents hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Transl. Res.* 164 : 452—459.
- Villalon C. M., Centurion D. 2007. Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Nauyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 376 : 45—63.
- Walston J., Silver K., Bogardus C., Knowler W. C., Celi F. S., Austin S., Manning B., Strosberg A. D., Stern M. P., Raben N., Sorokin J. D., Roth J., Shuldiner A. R. 1995. Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the  $\beta_3$ -adrenergic-receptor gene. *N. Engl. J. Med.* 333 : 343—347.
- Wulflele M. G., Kooy A., de Zeeuw D., Stehouwer C. D., Gansevoort R. T. 2004. The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *J. Intern. Med.* 256 : 1—14.
- Yu B., Pugazhenthi S., Khandelwal R. L. 1994. Effects of metformin on glucose and glucagon regulated gluconeogenesis in cultured normal and diabetic hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 48 : 949—954.
- Zhou G., Myers R., Li Y., Chen Y., Shen X., Fenyk-Melody J., Wu M., Ventre J., Doepper T., Fujii N., Musi N., Hirshman M. F., Goodyear L. J., Moller D. E. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108 : 1167—1174.
- Zhu X. C., Jiang T., Zhang Q. Q., Cao L., Tan M. S., Wang H. F., Ding Z. Z., Tan L., Yu J. T. 2014. Chronic metformin preconditioning provides neuroprotection via suppression of NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory pathway in rats with permanent cerebral ischemia. *Mol. Neurobiol.* DOI: 10.1007/s12035-014-8866-7.

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 WITH OBESITY

*K. V. Derkach, L. A. Kuznetsova, T. S. Sharova, P. A. Ignat'eva,  
V. M. Bondareva, A. O. Shpakov<sup>1</sup>*

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg;

<sup>1</sup> e-mail: alex\_shpakov@list.ru

Biguanide metformin, which is widely used for the treatment of type 2 diabetes mellitus, improves carbohydrate and lipid metabolism and shows a pronounced cardio- and neuroprotective effects. It is assumed that an important role in these effects of metformin plays its ability to positively influence the activity of NO-synthase catalyzing the synthesis of NO, the most important vasodilator, and the activity of hormone-sensitive adenylyl cyclase signaling system (ACSS). To prove this, we have carried out a study whose purpose was to study the effect of long-term metformin treatment on the metabolic rates in obese rats, as well as on the activity of ACSS and NO-synthase in the myocardium and the brain of these animals. The metformin treatment of Wistar rats with obesity induced by high-fat diet was carried out for 2 months (daily dose of 200 mg/kg). The treatment with metformin led to a decrease in body weight and body fat, reduced glucose and insulin levels as well as reduced insulin resistance index HOMA-IR, improved glucose tolerance, and decreased the level of atherogenic forms of cholesterol. In the myocardium of obese rats, the attenuation of ACSS stimulation induced by the agonists of  $\beta_1/\beta_2$ -adrenergic receptors (AR) and the strengthening of  $\beta_3$ -AR signaling has been found. At the same time, in the myocardium of animals treated with metformin, the regulation of ACSS by adrenergic agonists was restored, and the ratio of  $\beta$ -AR-signaling pathways returned to normal. In the brain of rats treated with metformin, adenylyl cyclase stimulating effects of serotonin and agonists of type 4 melanocortin receptors, which had been weakenend for obesity, were restored. Metformin treatment completely restored activity of total and endothelial NO-synthase in the myocardium decreased in obesity. It as also shown that metformin treatment induced hyperactivation of NO-synthase in the myocardium and brain of healthy animals. Thus, we conclude that the effects of metformin identified by us in rats with long-term treatment of obesity may explain cardio- and neuroprotective influence of this drug.

**Key words:** metformin, adenylyl cyclase, NO-synthase, obesity, adgeneric receptor, serotonin, brain, myocardium, vasodilatation.