

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Хафизова Айгуль Зульфаровна

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
МЕТФОРМИНА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ГЕРОПРОТЕКТОРА**

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Семина Ирина Ивановна

Казань – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Обоснование перспективности поиска лекарственных средств, обладающих геропротекторными свойствами	15
1.2 Определение процесса старения и связь с развитием возраст-ассоциированных заболеваний	17
1.3 Сахарный диабет 2-го типа и связь с развитием когнитивных нарушений.....	21
1.4 Метформин – как потенциальный кандидат-геропротектор.....	22
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	28
2.1 Дизайн работы	28
2.2 Объект исследования.....	29
2.3 Экспериментальные животные	30
2.4 Методы исследований.....	31
2.4.1 Методы поведенческого тестирования	31
2.4.2 Оценка относительного уровня экспрессии гена <i>Bdnf</i> в тканях крыс.....	35
2.4.3 Исследование экспрессии субъединиц белка <i>Bdnf</i> в тканях крыс	36
2.4.4 Биохимический анализ сыворотки крови крыс	37
2.5 Статистическая обработка данных эксперимента	38
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	39
3.1 Исследование влияния однократного и 14-дневного введения метформина в диапазоне доз на поведенческие характеристики половозрелых мышей-самцов..	39
3.1.1 Изучение влияния метформина на двигательную-исследовательскую активность половозрелых мышей в тесте «Открытое поле»	40

3.1.2 Исследование анксиолитического эффекта метформина на половозрелых мышцах.....	41
3.1.3 Оценка влияния метформина на процессы обучения и памяти половозрелых мышей в тесте «Т-образный лабиринт».....	44
3.1.4 Влияние метформина в высокой дозе на двигательную-исследовательскую активность половозрелых мышей в тесте «Открытое поле»	45
3.1.5 Влияние метформина в высокой дозе на уровень тревожности половозрелых мышей в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»	47
3.2 Исследование влияния 30-дневного введения метформина на процессы обучения и памяти, когнитивные функции и относительный уровень экспрессии гена <i>Bdnf</i> половозрелых крыс-самцов	48
3.2.1 Оценка влияния метформина на процессы обучения и памяти половозрелых крыс в тесте «Т-образный лабиринт».....	48
3.2.2 Исследование влияния метформина на пространственную память половозрелых крыс в тесте «Водный лабиринт Морриса».....	49
3.2.3 Исследование влияния метформина на уровень экспрессии гена <i>Bdnf</i> в структурах головного мозга половозрелых крыс.....	50
3.2.4 Исследование влияния метформина на когнитивные функции и уровень тревожности половозрелых крыс	51
3.2.4.1 Анксиолитическое действие метформина в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт».....	52
3.2.4.2 Оценка влияния метформина на тревожность и когнитивные функции половозрелых крыс в условиях острого стресса в тесте «Экстраполяционное избавление»	53
3.3 Исследование влияния 30-дневного введения метформина на физическую активность половозрелых крыс обоего пола	55
3.3.1 Исследование мышечной выносливости половозрелых крыс в комплексе «Ротарод» при введении метформина.....	55

3.3.2 Исследование локомоторной активности половозрелых крыс в тесте «Водный лабиринт Морриса» при введении метформина.....	56
3.3.3 Исследование влияния метформина на биохимические показатели сыворотки крови половозрелых крыс	58
3.4 Исследование влияния 30-дневного интраназального введения метформина на процессы обучения и памяти, когнитивные функции и экспрессию гена <i>Bdnf</i> половозрелых крыс-самцов	59
3.4.1 Исследование интраназального введения метформина на процессы обучения и памяти половозрелых крыс в тесте «Т-образный лабиринт»	59
3.4.2 Исследование влияния метформина на пространственную память половозрелых крыс в тесте «Водный лабиринт Морриса».....	60
3.4.3 Исследование влияния метформина на относительный уровень экспрессии нейротрофического фактора <i>Bdnf</i> половозрелых крыс	61
3.4.4 Исследование влияния метформина на когнитивные функции и уровень тревожности половозрелых крыс	62
3.4.4.1 Исследование влияния метформина на когнитивные функции и уровень тревожности половозрелых крыс в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Экстраполяционное избавление»	62
3.5 Исследование эффектов метформина при его 14-дневном введении старым мышам-самцам.....	65
3.5.1 Исследование влияния метформина на тревожность старых мышей в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»	66
3.5.2 Исследование влияния метформина на процессы обучения и памяти старых мышей в тесте «Т-образный лабиринт».....	67
3.6 Исследование эффектов метформина при его 30-дневном введении старым крысам обоего пола	68

3.6.1 Исследование влияния метформина на тревожность старых крыс в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»	69
3.6.2 Исследование пространственной памяти старых крыс в тесте «Водный лабиринт Морриса» при введении метформина	70
3.7 Исследование влияния метформина на относительный уровень экспрессии гена <i>Bdnf</i> в тканях старых крыс как один из ключевых механизмов действия метформина	71
ГЛАВА 4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	75
ВЫВОДЫ	87
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	88
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	89
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	92
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	108
ПРИЛОЖЕНИЯ	112
Приложение 1 – Влияние 30-дневного введения метформина на относительный уровень экспрессии нейротрофического фактора <i>Bdnf</i> в структурах головного мозга половозрелых крыс-самцов.....	112
Приложение 2 – Влияние 30-дневного введения метформина в дозе 35 мг/кг на экспрессию субъединиц белка <i>Bdnf</i> в гиппокампе половозрелых крыс-самцов .	113
Приложение 3 – Влияние 30-дневного введения метформина в дозе 35 мг/кг на экспрессию субъединиц белка <i>Bdnf</i> в префронтальной коре половозрелых крыс-самцов	114
Приложение 4 – Влияние 30-дневного введения метформина на биохимические показатели сыворотки крови половозрелых крыс обоего пола	115

Приложение 5 – Влияние 30-дневного введения метформина на относительный уровень экспрессии нейротрофического фактора <i>Bdnf</i> в тканях старых крыс обоего пола (возраст – 24 мес.)	116
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Согласно оценке и прогнозам Организации Объединенных Наций в области мирового народонаселения, численность людей в возрасте 50-60 лет продолжает расти, достигнув пика в 10,3 млрд человек к 2080 году. К середине 2030 годов в мире будет насчитываться 265 млн человек в возрасте 80 лет и старше [152]. По данным Федеральной службы государственной статистики, численность людей в Российской Федерации (РФ) в возрасте 65 лет и старше составляет 25,8 млн человек, что составляет 17,8% от общего количества населения [14]. Вышеуказанные статистические данные отражают тенденцию к общемировому старению населения и повышают актуальность поиска лекарственных средств, обладающих геропротекторными свойствами.

Старение представляет собой необратимое снижение физиологических функций, приводящее к развитию возраст-ассоциированных заболеваний со стороны различных систем организма (опорно-двигательного аппарата, нервной, сердечно-сосудистой, иммунной, пищеварительной систем и т. д.) [15, 63, 78, 90, 114, 136]. К признакам старения относят геномную нестабильность, дисфункцию теломер и митохондрий, эпигенетические изменения, нарушение протеостаза, клеточное старение, истощение стволовых клеток, изменение межклеточного взаимодействия, жесткость внеклеточного матрикса, а также активацию ретротранспозонов и хроническое воспаление (inflammaging) [15, 23, 78, 136]. Возраст-ассоциированные заболевания оказывают высокую нагрузку на систему здравоохранения и являются одной из ключевых проблем экономических расходов.

В настоящее время во всем мире ведутся поиски лекарственных средств, способных воздействовать на патогенез старения с целью повышения качества жизни пожилых людей [15, 31, 78, 90].

Перспективным средством может явиться метформин – пероральное противодиабетическое средство [15, 62, 78, 87, 126, 131, 136, 138, 153], включенное в перечень «Жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для

медицинского применения». В настоящее время метформин является единственным применяемым в клинической практике лекарственным средством при сахарном диабете 2-го типа (СД 2-го типа) [13, 15] из класса бигуанидов с доказанной эффективностью и безопасностью. В последние годы многие исследователи отмечают возможность применения метформина для профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний, а также в процессе биологического (физиологического) старения [13, 15, 31, 76, 78, 87, 136, 138]. Высокая распространенность нейродегенеративных заболеваний и снижение когнитивных функций является следствием процесса старения организма [87, 125].

Таким образом, профилактика преждевременного старения, повышение и улучшение качественно прожитых лет, лечение возраст-ассоциированных заболеваний являются приоритетным направлением современной геронтологии.

Данная исследовательская работа посвящена изучению возможности применения метформина как потенциального геропротектора в эксперименте на лабораторных животных разного возраста и пола.

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день существуют зарубежные исследования, посвященные изучению влияния метформина на когнитивные функции старых крыс-самцов [36], а также тревожное поведение половозрелых крыс-самцов [103]. Однако сведений о влиянии противодиабетического средства метформина в субтерапевтических дозах, не оказывающих гипогликемического действия, на поведенческие характеристики в процессе физиологического старения лабораторных животных с учетом половых различий недостаточно.

Цель исследования

Экспериментальное обоснование применения метформина для коррекции поведенческих и когнитивных изменений в процессе физиологического старения с учетом половых различий.

Задачи исследования

1. Исследовать влияние однократного и 14-дневного внутрижелудочного (в/ж) введения метформина в диапазоне доз (от 35 мг/кг до 700 мг/кг) на двигательную-исследовательскую активность, процессы обучения и памяти, а также тревожность половозрелых мышей-самцов.

2. Изучить влияние 30-дневного в/ж введения метформина в малых (субтерапевтических) дозах (70 мг/кг и 35 мг/кг), не оказывающих гипогликемического действия, на процессы обучения и памяти, когнитивные функции и тревожность половозрелых крыс-самцов, а также оценить влияние на изменение относительного уровня экспрессии гена нейротрофического фактора *Bdnf* и экспрессию субъединиц белка *Bdnf* в структурах мозга (гиппокамп, префронтальная кора) половозрелых крыс-самцов.

3. Изучить влияние 30-дневного в/ж введения метформина в дозах 70 мг/кг и 35 мг/кг на физическую активность и биохимические показатели сыворотки крови половозрелых крыс обоего пола (уровень глюкозы, холестерина, липопротеинов низкой плотности (ЛПНП)).

4. Исследовать влияние 14-дневного у старых мышей (возраст – 22 мес.) и 30-дневного у старых крыс обоего пола (возраст – 24 мес.) в/ж введения метформина в дозах 70 мг/кг и 35 мг/кг на процессы обучения и памяти, когнитивные функции и выраженность тревожного поведения старых животных, с последующей оценкой изменения относительного уровня экспрессии гена нейротрофического фактора *Bdnf* в тканях старых крыс обоего пола.

5. Изучить эффекты метформина при 30-дневном интраназальном (и/н) введении в дозе 70 мг/кг на поведение, процессы обучения и памяти, когнитивные функции половозрелых крыс-самцов, а также оценить его влияние на изменение относительного уровня экспрессии гена нейротрофического фактора *Bdnf* и экспрессию субъединиц белка *Bdnf* в структурах мозга (гиппокамп, префронтальная кора) половозрелых крыс-самцов.

Научная новизна

Впервые исследовано влияние малых доз (70 мг/кг и 35 мг/кг) метформина, не оказывающих гипогликемического действия при в/ж введении на поведенческие характеристики, процессы обучения и памяти, когнитивные функции, а также тревожность животных разного возраста и пола, а именно половозрелых мышей-самцов и крыс-самцов, а также старых мышей-самцов и старых крыс обоего пола.

Установлено, что 30-дневное в/ж введение метформина в дозе 35 мг/кг повышает относительный уровень экспрессии гена *Bdnf* в гиппокампе и префронтальной коре половозрелых крыс-самцов, а также повышает экспрессию субъединиц белка *Bdnf* в гиппокампе и префронтальной коре половозрелых крыс-самцов.

Выявлено, что 30-дневное в/ж введение метформина в дозе 35 мг/кг способствует увеличению относительного уровня экспрессии гена *Bdnf* в тканях (префронтальная кора, *musculus quadriceps*) старых крыс-самцов, но не самок, что может свидетельствовать о наличии половых различий в механизме действия метформина как потенциального геропротектора.

Показана эффективность метформина при и/н введении в дозе 70 мг/кг на процессы обучения и памяти, когнитивные функции, а также тревожность половозрелых крыс-самцов при его 30-дневном введении, что обосновывает перспективность изучения и/н пути введения метформина и необходимость разработки его лекарственной формы.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость заключается в существенном углублении представлений о влиянии противодиабетического средства метформина на поведенческие характеристики и когнитивные функции лабораторных животных в процессе физиологического старения.

Практическая значимость работы заключается в получении новых данных о влиянии противодиабетического средства метформин в малых дозах на поведение, процессы обучения и памяти, когнитивные функции и уровень тревожности

животных (мышей и крыс) разного возраста и пола. При этом следует отметить, что исследованные малые дозы метформина не способствуют развитию гипогликемического действия. Таким образом, в дальнейшем метформин возможно будет рассматривать как более безопасное анксиолитическое средство, а также, как средство, улучшающее процессы обучения и памяти, когнитивные функции в процессе физиологического старения.

Результаты проведенных экспериментальных исследований позволяют рассматривать перспективы для новых показаний к применению метформина, в том числе при его и/н введении.

Полученные результаты при и/н применении метформина обосновывают перспективность дальнейшей разработки его лекарственной формы для и/н введения с целью повышения биодоступности и биоадгезивных свойств метформина.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа представляет экспериментальное исследование, для выполнения которого были применены современные методы поведенческого тестирования, генетического, биохимического и статистического анализов. При подготовке обзора литературы использовались современные источники, отражающие актуальные достижения по теме диссертационного исследования.

Работа выполнена на базе кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России. Изучение относительного уровня экспрессии гена *Bdnf* проводилось совместно с к.б.н., старшим научным сотрудником Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России Валеевой Е.В. Исследование экспрессии субъединиц белка *Bdnf* выполнялось в сотрудничестве с д.м.н., доцентом кафедры общей патологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России Дунаевым П.Д.

Исследование одобрено на заседании Локального этического комитета ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России от 20.06.2023 (Протокол №6).

Положения, выносимые на защиту

1. Многократное введение метформина в малых (субтерапевтических) дозах (в отношении гипогликемического действия) снижает уровень тревожности и улучшает когнитивные функции старых крыс-самцов.
2. Многократное введение метформина в малых дозах оказывает анксиолитическое действие, улучшает когнитивные функции, процессы обучения и памяти половозрелых крыс-самцов.
3. Многократное введение метформина в субтерапевтических дозах повышает относительный уровень экспрессии гена нейротрофического фактора *Bdnf* в префронтальной коре старых крыс-самцов, а также в гиппокампе и префронтальной коре половозрелых крыс-самцов.
4. Интраназальное многократное введение метформина в малой дозе улучшает поведенческие характеристики половозрелых крыс-самцов, аналогичное эффекту при внутрижелудочном применении.

Личный вклад автора

Вклад автора в диссертационной работе выражался в создании плана и концепции работы, подготовке обзора литературы по теме исследования, организации и проведении всех экспериментальных процедур. Автор самостоятельно осуществляла обработку экспериментальных данных и оформила к печати публикации по результатам полученных исследований.

Внедрение результатов диссертационной работы в практику

Материалы диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры фармакологии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России.

Степень достоверности и апробация результатов

В процессе подготовки обзора литературы и обсуждения результатов были использованы актуальные источники литературы по теме диссертационного исследования. Дизайн экспериментальных исследований включал обязательное

использование как опытных, так и контрольных групп животных. Достоверность исследования обусловлена необходимым и достаточным числом экспериментального материала, с использованием современных методов исследования, которые позволили правильно провести статистическую обработку данных экспериментов и сформулировать выводы.

Апробация диссертации проведена на научно-проблемной комиссии «Фундаментальные, медицинские и биологические науки» ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (Протокол №6 от 8.04.2026 г.).

Основные результаты исследований были представлены в форме устных и постерных докладов на следующих научных конференциях:

– Всероссийском научном медицинском форуме студентов и молодых учёных с международным участием «Белые цветы» (Казань, 2022, 2023, 2024).

– Восьмой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Санкт-Петербург, 2023).

– LXXXV научно-практической конференции студентов и молодых учёных с международным участием «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины 2024» (Санкт-Петербург, 2024).

– Девятой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Сыктывкар, 2024).

– Саммите разработчиков лекарственных препаратов «СИРИУС.БИОТЕХ» (Сириус, 2024).

– Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых учёных (Москва, 2025).

Диссертант является победителем в конкурсе на соискание гранта Республики Татарстан «Алгарыш» в номинации «Молодые ученые».

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 13 работ, в том числе 4 статьи – в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования РФ, из них 3 статьи – в журналах, индексируемых в международной базе данных *Scopus*.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 116 страницах машинописного текста, содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материал и методы исследования, главы результатов собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, включающий 28 отечественных и 127 зарубежных авторов, а также 5 приложений. Работа проиллюстрирована 14 таблицами и 22 рисунками.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда «Молекулярные механизмы действия метформина в эксперименте как перспективного геропротектора и разработка оптимальных подходов для его доставки в мозг с целью лечения когнитивных нарушений и профилактики развития деменций» (проект № 23-25-00333).

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Обоснование перспективности поиска лекарственных средств, обладающих геропротекторными свойствами

Согласно данным Федеральной службы государственной статистики доля лиц в РФ старше трудоспособного возраста (мужчины в возрасте от 63 лет и более; и женщины в возрасте от 58 лет и более) по состоянию на 2024 год составляет 23,7% [27]. Общая численность пенсионеров в РФ на 1 января 2024 года составляет 41075 тыс. человек [14]. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) прогнозирует, что к 2070 году количество людей в возрасте 65 лет и старше достигнет отметки 2,2 млрд человек [152]. Таким образом, вышеуказанные статистические показатели отражают высокий уровень роста и актуализируют поиск потенциальных лекарственных средств, обладающих геропротекторными свойствами.

Геропротекторы – это фармакологические агенты, оказывающие влияние на механизмы развития старения [15, 111], способствующие снижению скорости старения и увеличению продолжительности жизни.

С клинической позиции геропротекторов с доказанной эффективностью на сегодняшний день не существует [112, 133]. Представлены различные базы данных потенциальных геропротекторных средств, такие как Geroprotectors.org и DrugAge [111].

Все геропротекторы подразделяются на подклассы в зависимости от того, на какие механизмы старения они влияют [53, 133]. Также ученые используют термин антивозрастные или anti-age средства [133].

Существует ряд основных (первичных) и дополнительных (вторичных) критериев с целью отбора потенциальных геропротекторов.

Основные критерии отбора потенциальных геропротекторов:

1. Увеличение продолжительности жизни на модельных организмах [20, 111, 112]. Геропротектор должен продлевать жизнь модели сверх максимальной продолжительности жизни, защищая ее от одного или нескольких механизмов старения.

2. Положительное влияние на биомаркеры старения [111, 112].
3. Большинство потенциальных геропротекторов оказывают профилактическое действие только при применении в относительно высоких концентрациях. Доза, увеличивающая продолжительность жизни, должна быть несколько меньше, чем высокая доза.
4. Минимальные нежелательные побочные эффекты при многократном применении геропротектора в терапевтической дозе [20].
5. Потенциальная польза от приема геропротекторов может проявиться через длительный период времени. Потенциальные геропротекторы должны улучшать параметры качества жизни, связанные со здоровьем, такие как физическое, умственное, эмоциональное или социальное функционирование человека.
6. Геропротекторы-кандидаты должны быть способны задерживать прогрессирование одного или нескольких возраст-ассоциированных заболеваний у человека.

Дополнительные критерии отбора потенциальных геропротекторов:

1. Мишень или механизм действия геропротектора, увеличивающего продолжительность жизни модельного организма, должны быть эволюционно сохранены.
2. Воспроизводимость геропротекторных эффектов на различных модельных организмах повышает вероятность обнаружения эффектов и у человека, даже при отсутствии известной консервативной мишени.
3. Потенциальные геропротекторы должны повышать устойчивость организма к неблагоприятным факторам окружающей среды [65, 112].

В будущем геропротекторы могут явиться одним из инструментов персонализированной медицины, способной сформировать медицину здорового долголетия [111].

Терапевтическая стратегия может быть направлена на замедление процесса биологического старения, воздействуя на определенные патогенетические механизмы старения. К таким перспективным средствам относят: сенолитики

(физетин, кверцетин, навитоклакс), усилители никотинамид мононуклеотида, метформин, рапамицин (и другие ингибиторы мишени рапамицина у млекопитающих (mTOR)), противовоспалительные средства (ибупрофен, ацетилсалициловая кислота) и др. [15, 31, 90, 111].

Однако, следует понимать, что выявление терапевтического потенциала любого лекарственного средства, определение его фармакологической активности напрямую взаимосвязано с возможным развитием нежелательных лекарственных реакций. Так как, выявление и наличие побочных эффектов исследуемого средства может способствовать снижению потенциала лекарства и превалировать перед выявленными положительными эффектами. Таким образом, интерес для ученых, работающих в области изыскания геропротекторных средств представляют известные средства, применяемые в клинической практике длительный период, а также соответствующие критериям доказанной эффективности и безопасности.

1.2 Определение процесса старения и связь с развитием возраст-ассоциированных заболеваний

Старение (биологическое старение) – физиологический процесс, опосредованный многочисленными биологическими и генетическими путями. Старение представляет собой необратимое, прогрессирующее снижение адаптационных [3, 78, 90, 133] возможностей человека [31, 32, 50, 905, 133], оказывающее влияние на качество и продолжительность жизни человека [15, 32, 133, 136]. Отличительными признаками старения являются биологические процессы, приводящие к постепенному снижению функциональных возможностей и развитию возраст-ассоциированных заболеваний [15, 31, 78, 114, 136].

К молекулярным признакам старения относят: геномная нестабильность, дисфункция теломер и митохондрий, эпигенетические изменения, нарушение протеостаза и аутофагии [15, 23, 31, 78, 85, 133].

К клеточным признакам старения относят: клеточное старение (необратимая потеря способности клеток к делению), истощение стволовых клеток и хроническое воспаление (inflammaging) [23, 31, 78, 85, 133].

Геномная нестабильность связана с накоплением генетических повреждений, нарушающих клеточный гомеостаз [31, 77]. С возрастом в процессе репарации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) появляются дефекты, влияющие на экспрессию генов [31, 133], что приводит к дисфункции клеток [31] и, в итоге, к их гибели [133].

Теломеры – это последовательности на дистальных концах хромосом. В случае, если во время деления клетки теломеры достигают критически короткой длины, называемой пределом Хейфлика, происходит повреждение ДНК, что приводит к клеточному старению [15, 31, 134]. Повреждение ДНК вызывает остановку клеточного цикла и экспрессию противовоспалительных факторов, что в результате приводит к старению клеток [6]. Однако важно отметить, что укорочение теломер является процессом, связанным с естественным старением организма [31, 135]. Длина теломер контролируется активностью теломеразы [31], при этом активность самой теломеразы также снижается с возрастом [31, 44]. Предполагается, что фармакологическое воздействие на активность фермента теломеразы может явиться одной из стратегий для замедления старения.

Митохондрии играют важную роль в окислительном метаболизме [49, 136]. Показано, что ожирение, резистентность к инсулину и нарушение окислительных процессов в митохондриях приводят к накоплению токсичных промежуточных метаболитов [49, 108]. Дисфункция митохондрий приводит к дефициту дыхательной цепи, увеличивается продукция реактивных форм кислорода, уменьшается уровень аденозинтрифосфорной кислоты, это способствует апоптозу и воспалению, что напрямую ведет к возрастным изменениям [31, 136]. На процесс старения влияет ряд сложных механизмов, и многие из этих факторов связаны с хроническим окислительным стрессом, вызванным повышением уровня реактивных форм кислорода [68, 133].

Эпигенетические изменения включают метилирование ДНК, модификацию гистонов, ремоделирование хроматина и изменение транскрипции с помощью некодирующих рибонуклеиновых кислот ((РНК) [55, 133, 136].

Внутриклеточный протеостаз может быть нарушен вследствие замедления процесса трансляции и окисления белков [69, 78, 147]. Нарушение протеостаза запускает адаптивные изменения в клетках [133]

Аутофагия – это процесс, разрушающий клеточные компоненты, включая дефектные органеллы и неправильно свернутые белковые агрегаты в лизосомах [40, 133, 140]. Это связано с активацией 5'-АМФ-активируемой протеинкиназы (АМФК) и ингибированием mTOR. Известно, что процесс аутофагии снижается с возрастом [31, 40, 54, 136].

Старение клеток оказывает влияние на поддержание нормального гомеостаза. Клеточное старение – это постепенное снижение способности к пролиферации и дифференцировке, а также физиологической функции клеток с течением времени [31].

Семейство сиртриуинов (*SIRT*) были изучены как потенциальные факторы антистарения [31, 67, 145]. Так, например, выявлено, что *SIRT1* и *SIRT3* способствуют улучшению здорового старения млекопитающих [110]. Влияние на экспрессию *SIRT1* способствует защите эндотелиальных клеток от старения, вызванного гипергликемией [101]. В исследованиях *in silico* показано, что метформин может активировать *SIRT1* [100].

Старение связано с иммунной дисрегуляцией [120]. Отмечается, что у пожилых людей наблюдается повышенный уровень маркеров воспаления интерлейкин 1 (IL-1), IL-6, антагонист рецептора интерлейкина-1, IL-8, IL-13, IL-18, С-реактивный белок, интерферон α (IFN α) и IFN β , фактор некроза опухоли α (TNF α), сывороточный амилоид А и т.д. [7].

Старение является фактором развития таких хронических заболеваний, как СД 2-го типа, сердечно-сосудистые патологии [15, 136, 151], нейродегенеративные заболевания (деменции различной степени тяжести [15, 136], болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона), рак, глаукома, атеросклероз, неалкогольная жировая болезнь печени, доброкачественная гиперплазия предстательной железы и т.д., приводящие к ухудшению качественно прожитых лет и инвалидности [31, 63, 133, 146].

Старение является одним из факторов развития когнитивной дисфункции [107]. Нейродегенеративные заболевания могут являться следствием биологического старения организма [31]. Как правило, болезнь Альцгеймера поражает людей в возрасте от 65 лет [146]. Подобные расстройства часто ассоциированы с нарушениями поведения, повышенной тревожностью, состоянием апатии и т.д. [15]. Большинство пожилых людей имеют комплекс хронических заболеваний, что также приводит к сложностям в проведении медикаментозного лечения [15, 85].

В процессе старения происходит снижение уровня нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) и нарушение функции астроцитов, что в совокупности способствует развитию когнитивных нарушений [15, 107].

BDNF (нейротрофический фактор мозга) – это белок, который является одним из самых широко представленных нейротрофинов в головном мозге [34, 47], кодируемого одноименным геном *BDNF*. Нейротрофины – семейство трофических факторов, выполняющие плеiotропные функции для выживания, созревания и активности нейронов [34]. Как известно, BDNF экспрессируется в головном мозге [34] и играет важную роль в росте, развитии и пластичности нейронов [47], а также в развитии патологических состояний центральной нервной системы (ЦНС) [4].

Нейротрофический фактор считается важным медиатором функциональной и структурной пластичности ЦНС, влияющим на нейрогенез. Изменение в скорости нейрогенеза у взрослых людей может влиять на некоторые процессы обучения и памяти, в том числе способствовать развитию депрессивного настроения [47, 59]. Повышение активности BDNF связано с улучшением процессов памяти и обучения [4]. Поэтому изучение оценки влияния метформина на нейротрофический фактор мозга является одним из направлений проведенного исследования.

На основании вышеизложенного, системе здравоохранения следует уделять внимание поиску и разработке лекарственных средств, обладающих геропротекторными свойствами, с целью разработки системы качественного здорового долголетия.

Предполагается, что метформин может оказывать профилактическое и лечебное действия на заболевания, возникающие в процессе старения [31, 87, 96]. На основе литературных данных наблюдается тенденция к тому, что метформин рассматривается как один из наиболее перспективных кандидатов геропротекторов для терапии поведенческих и когнитивных нарушений, в том числе при нейродегенеративных заболеваниях в процессе физиологического старения [87].

1.3 Сахарный диабет 2-го типа и связь с развитием когнитивных нарушений

Согласно ВОЗ, сахарный диабет является одной из десяти главных причин смертей в мире [57]. СД 2-го типа диагностирован у 422 млн человек [33, 57], а состояние преддиабета у 374 млн человек [72]. Прогнозируется, что к 2030 году распространенность СД 2-го типа достигнет 7079 человек на 100 000 населения [15, 57].

СД 2-го типа представляет собой хроническое метаболическое заболевание, характеризующееся многочисленными патофизиологическими нарушениями: относительной инсулиновой недостаточностью, инсулинорезистентностью, приводящее к усилению глюконеогенеза [15]. Важно понимать, что СД 2-го типа приводит к поражению всех жизненно-важных органов, включая головной мозг [87]. СД 2-го типа характеризуется сложностью патогенетических процессов, нарушением синтеза инсулина, изменением чувствительности к инсулину, повреждением сосудов, нарушением различных видов обмена (углеводного, липидного), воспалением и дисбалансом кишечной микрофлоры [33, 57, 87].

Биохимические нарушения при СД 2-го типа сопровождаются гиперинсулинемией, высоким уровнем триглицеридов и ЛПНП, низким уровнем липопротеинов высокой плотности, увеличением концентрации ингибитора активатора плазминогена-1 и С-реактивного белка [73].

Системное воспаление, окислительный стресс играют важную роль в патогенезе СД 2-го типа [13]. Кроме того, окислительный стресс считается одним из факторов развития и прогрессирования когнитивных нарушений при сахарном диабете [70, 116].

При когнитивных нарушениях существует взаимосвязь между окислительным стрессом, резистентностью к инсулину, нейровоспалением и нарушением липидного обмена [244, 109, 122].

Первоначально терапия при СД 2-го типа направлена на коррекцию образа жизни пациента и назначение монотерапии. Однако, в случае прогрессирования заболевания, назначается комбинированная терапия с инсулином [73] или другими препаратами для лечения СД 2-го типа (сульфонилмочевина, тиазолидины, ингибиторы дипептидилпептидазы-4 и т.д.) [73, 124].

Сахарный диабет является фактором, который почти вдвое удваивает риск развития деменции [5, 141, 149]. В некоторых исследованиях сообщалось о повышенном риске возникновения когнитивных нарушений при сахарном диабете [37, 116, 137, 141].

В настоящее время когнитивные нарушения рассматриваются как осложнения, возникающие вследствие СД 2-го типа [46, 78, 87]. Наука выделяет понятие сахарного диабета 3-го типа, включающего в себя кроме сахарного диабета, сопутствующие заболевания, например болезнь Альцгеймера [33, 75].

Известно, что состояние гипогликемии приводит к тому, что головной мозг начинает использовать кетоновые тела как источник энергии [15]. Тем самым, СД 2-го типа имеет тесную взаимосвязь с развитием когнитивных дисфункций [96, 104].

1.4 Метформин – как потенциальный кандидат-геропротектор

Приоритетным направлением мировой и российской науки является борьба со старением, а также с заболеваниями, ассоциированными со старением, путем применения геропротекторных средств [15].

История создания метформина начинается с XVII века, когда листья *Galega officinalis*, содержащие в своем химическом составе гуанидиновые основания, подобные метформину, применялись для лечения чумы, лихорадки и при укусах змей. В 1992 году Вернер и Белл синтезировали метформин [42, 45, 49, 84, 126] и родственные ему бигуаниды, фенформин и буформин. В настоящий момент

фенформин и буформин не используются в клинической практике, так как имеют более высокую частоту появления серьезного побочного эффекта – лактатного ацидоза [42, 76, 126, 131].

Метформин является наиболее часто применяемым средством для терапии СД 2-го типа [35, 36, 41, 117], включенным во все международные рекомендации [45], однако в настоящее время, ученые изучают свойства метформина не только в целях терапевтического лечения диабета [15, 45].

По химической структуре метформин представляет 1,1-диметилбигуанид гидрохлорид, биодоступность метформина оценивается в 50-60% [8, 35]. Метформин является высокогидрофильным соединением, не связывается с белками плазмы крови [63]. Он медленно и неполностью всасывается в проксимальном отделе тонкого кишечника [43, 64] при пероральном применении, поэтому дозы метформина принимаемые при СД 2-го типа являются относительно высокими (0,5-2 г), период полувыведения составляет 1,5-4 часа из плазмы крови [73, 76].

Метформин пероральное противодиабетическое средство, препарат выбора для терапии СД 2-го типа. Метформин снижает уровень глюкозы в крови при СД 2-го типа, не вызывая при этом гипогликемии [15, 79]. Механизмы сахароснижающего действия метформина опосредованы несколькими путями, которые будут описаны ниже. Метформин ингибирует печеночный глюконеогенез [15, 25, 76, 78, 79, 106, 148] и увеличивает потребление глюкозы мышцами [76]. Также метформин повышает чувствительность периферических тканей к инсулину и уменьшает абсорбцию глюкозы в кишечнике [15, 25, 45, 73, 78, 79, 83]. Метформин уменьшает инсулинорезистентность и, уменьшая глюконеогенез, устраняет метаболические нарушения, наблюдаемые при СД 2-го типа [15, 29, 126, 131]. Доказано, что метформин ингибирует активность митохондриального комплекса 1, что приводит к снижению уровня глюкозы в крови [45, 76, 78, 123]. В дальнейшем это приводит к активации АМФК, которая регулирует метаболизм глюкозы [45, 76, 115, 123]. Метформин модулирует уровень глюкагонподобного

пептида-1 с помощью активации АМФК-путей в двенадцатиперстной кишке [66, 73, 78, 83, 91, 106, 143, 150].

Метформин является препаратом первой линии [38] для людей с СД 2-го типа, которые не могут достичь целевых показателей только с помощью диеты и здорового образа жизни [45]. Метформин применяют в высоких дозах для лечения СД 2-го, а именно от 500 до 2000 мг в сутки, разделенных на два или три приема [76].

Согласно данным Программы профилактики диабета (Diabetes Prevention Program) метформин эффективен в профилактике развития диабета у пациентов с преддиабетом [49, 78, 79, 89].

Метформин может применяться в комбинации с другими сахароснижающими средствами (производные сульфонилмочевины, ингибиторами дипептидилпептидаза-4, и другими группами) благодаря своему профилю безопасности и относительно низкому риску гипогликемии [45, 48, 126, 131]. Комбинированное применение способно обеспечить комплексный подход в контроле уровня глюкозы в крови.

Известно, что диабет вызывает нейродегенеративные нарушения за счет повышенного образования конечных продуктов гликирования (КПГ). КПГ – группа молекул, активирующие специфичные рецепторы конечных продуктов гликирования, приводящие к образованию реактивных форм кислорода и воспалительному ответу [3, 87]. Поэтому КПГ рассматриваются как факторы старения, обнаруженные в различных тканях и органах [3, 118, 144], а также как факторы развития нейродегенеративных расстройств, атеросклероза и других возрастных заболеваний [15]. Накопление КПГ может вызывать митохондриальную дисфункцию, гибель стволовых клеток за счет подавления АМФК и нижестоящих сигнальных путей.

Метформин может оказывать влияние на нейропротекцию путем активации АМФК-зависимых путей в стволовых клетках. Предполагается, что АМФК является терапевтической мишенью метформина [76, 79, 88, 93, 136]. АМФК – фактор, играющий ключевую роль в регуляции многих внутриклеточных систем

[49, 78, 89, 95]. Активация АМФК-зависимых путей приводит к снижению эффектов КПП, восстанавливает дисфункцию митохондрий, оказывает нейропротекторное действие на стволовые клетки [15, 93]. Учеными была выдвинута гипотеза о том, что терапия метформина может обеспечить защиту от болезни Альцгеймера [87].

Метформин обладает противовоспалительными, антиоксидантными и антиапоптотическими свойствами [46, 60, 76, 78, 87, 90, 126]. Известно, что окисленные белки и липиды играют роль в патогенезе болезни Альцгеймера. Также в патогенезе нейродегенерации важную роль играет воспаление. На модельных организмах показано, что метформин снижает уровень окислительного стресса и маркеров повреждения (IL-1) [87, 102]. Данный эффект может быть связан с тем, что метформин уменьшает уровень малонового диальдегида и повышает активность супероксиддисмутазы [15, 92]. Противовоспалительное действие метформина связано с подавлением IL-6, TNF α и активацией транскрипционного фактора (NF- κ B) посредством фосфорилирования комплекса, который является частью каскада NF- κ B (I κ B) и ингибирования высвобождения цитокинов [35, 60, 78, 90, 94, 97, 98, 99]. Подавляя противовоспалительные реакции в организме, защищая митохондрии и сосуды, а также воздействуя на стволовые клетки, метформин может защищать от нейродегенеративных расстройств [90, 140]. Метформин, оказывая положительное влияние на функцию сосудов, может замедлять процесс старения, обеспечивать защиту возрастного ухудшения когнитивных способностей.

В экспериментах *in vitro* метформин оказывает ингибирующее влияние на активность фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ) [8]. АХЭ – фермент, который отвечает за гидролиз нейромедиатора ацетилхолина, ответственный за процессы обучения и памяти [15, 30]. Показано, что хроническое 30-дневное введение метформина в дозе 500 мг/кг [15] уменьшало активность холинэстеразы у крыс с сахарным диабетом, при этом при 5-дневном введении метформина статистически значимых отличий от группы контроля выявлено не было [121].

В другом исследовании это было также подтверждено, метформин уменьшал активность АХЭ в головном мозге крыс с моделью сахарного диабета, индуцированного стрептозотоцином [55]. Следовательно, подавляющее действие метформина на АХЭ может быть одним из механизмов, способствующих улучшению когнитивных функций у крыс с СД 2-го типа.

Так, например, некоторые данные свидетельствуют о том, что метформин может способствовать функциональному восстановлению дефицита памяти и оказывать нейропротекторное действие на трансгенных мышах с моделью болезни Альцгеймера APP/PS1 через запуск нейрогенеза и противовоспалительного процесса, опосредованного регуляцией сигнальных путей АМФК в гиппокампе, что может способствовать улучшению неврологического дефицита [104].

С учетом полезных свойств метформин может явиться многообещающим кандидатом на роль геропротектора.

Однако следует учитывать, что метформин обладает побочными эффектами, особенно со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (наиболее частыми симптомами являются диарея, изжога, тошнота, рвота, боль в животе, метеоризм [38, 84, 126]), потеря аппетита [73], нарушение всасывания витамина В₁₂ [38, 49, 81, 84, 126, 128], поэтому необходим мониторинг уровня витамина В₁₂. Точный механизм развития дефицита В₁₂ не известен, но это может быть связано со снижением всасывания В₁₂ в кишечнике [45, 81]. Побочный эффект со стороны ЖКТ является дозозависимым [49, 74] и связан с накоплением метформина в кишечных энтероцитах и усилением утилизации глюкозы, что приводит к образованию лактата, а также это связано с изменениями в микробиоте [41, 49, 74]. Молочнокислый ацидоз проявляется достаточно редко (5 на 100 000 населения), однако является серьезным побочным эффектом, так как при отсутствии лечения приводит к летальному исходу. В основном наблюдается у пациентов с СД 2-го типа с ярко выраженной почечной недостаточностью [45, 49, 61, 71, 73, 74, 76, 119].

Результаты 20-летнего Британского проспективного исследования сахарного диабета (United Kingdom Prospective Diabetes Study) показывают, что метформин снижает смертность у пациентов с СД 2-го типа на 42%, однако механизмы

воздействия метформина на сердечно-сосудистую систему не изучены [42, 49, 56, 76, 79, 90, 126].

На основании 60-летнего применения метформина в качестве препарата первой линии для терапии СД 2-го типа [15, 78, 126], метформин признается сравнительно безопасным лекарственным средством [15, 126, 131]. В совокупности вышеуказанных данных о положительных свойствах для лечения СД 2-го типа, пользе при сердечно-сосудистых заболеваниях, ожирении и когнитивных нарушениях, возможно рассматривать более широкое применение препарата в качестве профилактического средства для борьбы со старением с целью уменьшения негативных последствий старения, проявляющихся различными патологическими состояниями и дисфункциями, в том числе со стороны ЦНС.

Из вышесказанного следует, что изучение метформина как потенциального геропротектора на лабораторных животных разного возраста и пола позволит определить, какие изменения происходят при его применении у животных и предположить возможный механизм воздействия метформина на геропротекцию.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн работы

Дизайн исследовательской работы представлен в таблице 1. Работа выполнена на лабораторных животных разного возраста и пола.

Таблица 1– Дизайн исследования

Исследования на половозрелых животных	Исследования на старых животных
Исследование влияния однократного и 14-дневного в/ж введения метформина мышам-самцам на поведенческие характеристики (поведение, уровень тревожности, процессы обучения и памяти).	Исследование влияния 14-дневного в/ж введения метформина старым мышам-самцам (возраст – 22 мес.) на поведенческие характеристики (уровень тревожности, процессы обучения и памяти).
Исследование влияния 30-дневного в/ж и и/н введения метформина крысам-самцам на поведенческие характеристики (процессы обучения и памяти, когнитивные функции и уровень тревожности).	Исследование влияния 30-дневного в/ж введения метформина старым крысам обоего пола (возраст – 24 мес.) на выраженность тревожного состояния и когнитивные функции.
Оценка относительного уровня экспрессии гена <i>Bdnf</i> и субъединиц соответствующего белка в структурах головного мозга крыс-самцов (гиппокамп, префронтальная кора).	Исследование относительного уровня экспрессии гена <i>Bdnf</i> в тканях старых крыс обоего пола (3 типа структур головного мозга:
Исследование влияния 30-дневного в/ж введения метформина на физическую активность и биохимические показатели сыворотки крови крыс обоего пола (уровень глюкозы, холестерина, ЛПНП).	гиппокамп, префронтальная кора, мозжечок. 3 типа мышечных волокон: <i>gastrocnemius</i> , <i>musculus soleus</i> , <i>musculus quadriceps</i>).

2.2 Объект исследования

Объектом исследования явилось противодиабетическое средство метформин («ОзонФарм», Россия) (рисунок 1).

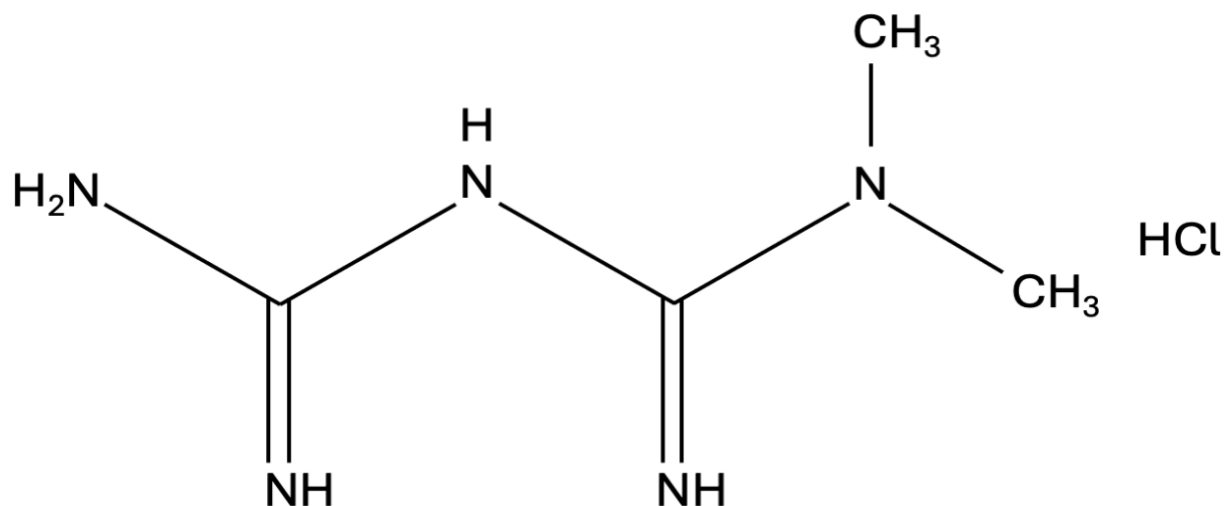


Рисунок 1– Структурная формула метформина гидрохлорида

Исследование фармакологической активности метформина проводилось в диапазоне доз и путях введениях, представленных в Таблице 2.

Таблица 2 – Диапазон доз и путей введения метформина лабораторным животным

Путь введения	Половозрелые мыши	Половозрелые крысы		Старые мыши (22 мес.)	Старые крысы (24 мес.)
	В/ж	В/ж	И/н	В/ж	
Дозы исследуемого препарата	700 мг/кг	70 мг/кг	70 мг/кг	70 мг/кг	
	350 мг/кг			70 мг/кг	
	70 мг/кг	35 мг/кг		35 мг/кг	
	35 мг/кг			35 мг/кг	

2.3 Экспериментальные животные

Животные получены из питомника филиала «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Фармакологические исследования выполнены на лабораторных животных (мыши и крысы) разного возраста и пола. Подробное описание используемых животных представлено в Таблице 3.

Таблица 3 – Лабораторные животные, применяемые в работе

Вид животного	Возраст (мес.)	Вес (г)	Кол-во животных
Старые крысы-самцы линии <i>Wistar</i>	24	550-600	24
Старые крысы-самки линии <i>Wistar</i>	24	250-300	24
Беспородные старые мыши-самцы	22	45-50	21
Половозрелые крысы-самцы линии <i>Wistar</i>	5	180-200	104
Половозрелые крысы-самки линии <i>Wistar</i>	5	150-180	24
Беспородные половозрелые мыши- самцы	5	18-25	70

До начала экспериментов все животные содержались в стандартных условиях вивария с естественным световым режимом на полнорационной сбалансированной диете с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по

защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей.

Экспериментальные исследования фармакологической активности метформина выполнялись в соответствии с положениями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [22].

2.4 Методы исследований

2.4.1 Методы поведенческого тестирования

Все поведенческие тесты начинались преимущественно с 9:00 часов утра в звукоизолированных и вентилируемых помещениях.

1. Тест «Открытое поле» [16] широко применяется в нейробиологических исследованиях для оценки двигательной и исследовательской активности животных. Установка «Открытое поле» (научно-производственная компания (НПК) «Открытая наука», Россия) использовалась в адаптированном варианте для экспериментов с мышами. В день тестирования испытуемому животному вводили метформин за 30 минут до начала поведенческого тестирования. Контрольным группам вводили физиологический раствор (0,9% NaCl). Далее животное помещали в центр установки, где пол арены исчерчен на ряд секторов (центр, 2/3 и периферия) и проводили запись поведения животного в течение 3 минут с применением цифровой системы. Используемое освещение составляло 80 LUX. Животных контрольных групп тестировали аналогичным методом.

В ходе 3-минутного теста регистрировались следующие показатели:

- количество пересечённых линий, что отражает уровень двигательной активности животного. Переход животного из одного сектора установки в другой фиксировался при условии, что все лапы животного полностью пересекли границу.
- количество обследованных отверстий, что отражает уровень исследовательской активности [16, 24, 113, 132].

После окончания эксперимента животное помещали обратно в клетку.

2. Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» [113] применяется для исследования уровня тревожности животного. В основе теста лежит боязнь к открытым пространствам, которое проявляется тем, что животное больше времени проводит в «закрытых» рукавах (ЗР) лабиринта. Установка «Приподнятый крестообразный лабиринт» (НПК «Открытая наука», Россия) применялась в двух модификациях (для мышей и крыс).

В день тестирования испытуемому животному вводили метформин за 30 минут до начала поведенческого тестирования. Контрольным группам вводили физиологический раствор (0,9% NaCl) [26]. Далее животное помещали в центральный квадрат лабиринта лицом к «открытому» рукаву и в течение 5 минут записывали его поведение с использованием цифровой системы. Контрольные группы животных тестировались по аналогичной методике.

В ходе 5-минутного тестирования фиксировались следующие показатели:

– продолжительность пребывания в «открытых» рукавах (ОР) установки (с), что является обратным показателем тревожности, то есть уменьшение времени избегания «открытых» рукавов отражает более низкий уровень тревоги.

– продолжительность пребывания в «закрытых» рукавах установки (с). [16, 22, 132].

После окончания эксперимента животное помещали обратно в клетку.

3. Тест «Т-образный лабиринт» [16] используется для оценки процессов обучения и памяти у животных. Для этого применялась установка «Т-образный лабиринт» (НПК «Открытая наука», Россия). На протяжении 5 дней животное обучали делать выбор правильного рукава с пищевым подкреплением, давалось 10 попыток длительностью 2 минуты. За 48 часов до начала обучения была осуществлена депривация еды. С первого дня тестирования животное помещали в центральный отсек лабиринта, после чего через 15 секунд поднимали дверцу. Обучение продолжалось в течение 4 дней. На пятый день у каждого животного регистрировали латентный период выбора правильного рукава (с). В качестве пищевого подкрепления использовали картофельные чипсы. Тестирование проводилось в одно и то же время суток. Установка применялась в двух

модификациях: для мышей и для крыс [16, 22, 51, 52]. После окончания эксперимента животное помещали обратно в клетку.

4. Тест «Водный лабиринт Морриса» [16] служит для исследования пространственной памяти и локомоторной активности животного. Установка «Водный лабиринт Морриса» (НПК «Открытая наука», Россия) представляет собой круглый бассейн, где на уровне 2 см под водой располагается скрытая платформа [26]. Воду окрашивали с помощью сухого молочного порошка, для избежания попадания платформы в зрительное поле животного. Температура воды на протяжении всех дней тестирования составляла 25°C. Были установлены зрительные ориентиры по 4 сторонам бассейна.

Тестирование половозрелых крыс-самцов. На этапе обучения животное обучали на протяжении 3 дней самостоятельно искать платформу. Животное делало 3 попытки длительностью 2 минуты. Если животное не находило платформу, то его плавно подводили к ней. На заключительный 4 день тестирования регистрировали: длительность поиска платформы (с), что является критерием оценки пространственной памяти животного. После завершения теста животное высушивали и возвращали обратно в клетку [16, 22, 36].

Тестирование половозрелых крыс обоего пола. На этапе обучения животное обучали на протяжении 3 дней самостоятельно искать платформу. Животное делало 3 попытки длительностью 2 минуты. Если животное не находило платформу, то ее плавно подводили к ней. На заключительный 4 день тестирования регистрировали: скорость плавания (см/с) и пройденный путь (см), что являлось оценкой локомоторной активности животного. После завершения теста животное высушивали и возвращали обратно в клетку [16, 22, 36].

Тестирование старых крыс обоего пола. На этапе обучения животное обучали на протяжении 3 дней самостоятельно искать платформу. Животное делало 3 попытки длительностью 2 минуты. Если животное не находило платформу, то его плавно подводили к ней. На заключительный 4 день тестирования платформу убрали и регистрировали: длительность нахождения в зоне платформы (с). После

завершения теста животное высушивали и возвращали обратно в клетку [16, 22, 36].

5. Тест «Экстраполяционное избавление» [24] применяется для исследования уровня тревожности животного в условиях острого стресса и выявления у лекарственного средства влияния на мнестические функции. Установка «Экстраполяционное избавление» (НПК «Открытая наука», Россия) представляет емкость с прозрачным цилиндром в центре. Для тестирования необходимо наличие воды 22°C, цилиндр был погружен в воду на 2,5 см.

Животное осторожно помещали внутрь прозрачного цилиндра, удерживая хвостом вниз. Затем запускали секундомер и регистрировали следующие параметры:

- продолжительность периода прыжков (с) (чем выше количество прыжков, тем выше уровень стресса у животного).
- латентный период подныривания под край цилиндра (с), который отражает уровень когнитивных функций в острых стрессогенных условиях.

Если животное совершало подныривание, его сразу извлекали из установки, либо по истечении 2 минут, если животное не решало задачу. Водное пространство цилиндра является стрессогенным фактором, из которого можно выбраться только при подныривании под край цилиндра [8, 16, 22, 28]. После окончания эксперимента животное помещали обратно в клетку.

6. Тест «Темно-светлая камера» [16] используется для исследования уровня тревожности животного в условиях переменной стрессогенности. Установка «Темно-светлая камера» (НПК «Открытая наука», Россия) состоит из двух камер, разделенных небольшим проходом. Первая камера выполнена из белых пластиковых стенок и хорошо освещена. Вторая камера окрашена в черный цвет и не освещена. Мышь помещали в светлый отсек и в течение 5 минут регистрировали время, проведенное в светлом отсеке (с) [16, 22].

7. Комплекс «Ротарод» (ООО «Нейроботикс», Россия) применяется для изучения мышечной выносливости животных и представляет собой барабан (стержень, диаметром 70 мм), вращающийся (10 об/мин) на неподвижном лафете.

В основу методики положена способность животных удерживаться на стержне и избегать падения. Тестируемое животное помещали на вращающийся стержень и регистрировали время удержания на нем (с) в течении 2 мин. [2, 10]. После окончания эксперимента животное помещали обратно в клетку.

2.4.2 Оценка относительного уровня экспрессии гена *Bdnf* в тканях крыс

После 30-дневного в/ж и и/н введения метформина и физиологического раствора (0,9% NaCl) половозрелым крысам-самцам, с испытуемыми животными проводили поведенческое тестирование. После проведения поведенческого тестирования была осуществлена декапитация животных с помощью гильотины (ООО «НПК Открытая Наука», Россия) и забор структур головного мозга крыс (гиппокамп, префронтальная кора) в индивидуальные пробирки.

После 30-дневного в/ж введения метформина и физиологического раствора (0,9% NaCl) старым крысам обоего пола, с испытуемыми животными проводили поведенческое тестирование, далее – декапитировали с использованием гильотины (ООО «НПК Открытая Наука», Россия). Биологическим материалом служили образцы тканей – 3 типа структур мозга: префронтальная кора, мозжечок и гиппокамп, 3 типа мышечных волокон: *musculus soleus*, *musculus quadriceps*, *gastrocnemius*. Биоматериал помещали в морозильную камеру при -80°C до последующего анализа.

Выделение тотальной РНК и обратная транскрипция. Выделение РНК из цельной крови и биоптатов тканей включало все этапы лизирования и очистки РНК согласно инструкции производителя «ExtractRNA» (Евроген, Москва). Для количественной оценки концентрации и чистоты выделенной РНК использовали спектрофотометр «Nanodrop Lite» (ThermoFisher, Соединённые Штаты Америки (США)).

Синтез первой цепи комплементарной ДНК был проведен с применением генетически модифицированной обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей (M-MuLV-RN), 1 мкг суммарной РНК, случайных гексапраймеров и 5×OT-буфер-*mix* согласно инструкции набора (Биолабмикс, Россия).

Количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени.

Для проведения ПЦР в реальном времени была подготовлена реакционная смесь, состоящая из буфера БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×) (Биолабмикс, Россия), подготовленных праймеров для референсного гена *Gapdh* (прямой праймер 5'-CGACCCCTTCATTGACCTCAACTAC-3', обратный праймер CACTCCACCACATACTCAGCACCG) и гена интереса *Bdnf* (прямой праймер GTGACAGTATTAGCGAGTGGG, обратный праймер GGGATTACACTTGGTCTCGTAG) (Евроген, Россия) и стерильной воды. С подготовленной смесью проводили количественную ПЦР на амплификаторе CFX96 (BioRad, США): 95°C - 5 мин., 40 циклов: 95°C - 15 с, 61°C - 30 с с детекцией результата по флуоресцентному сигналу SYBR Green I. Подсчет относительного уровня экспрессии гена *Bdnf* проводился с использованием данных Cq (Cycle Quantification) по формуле $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

2.4.3 Исследование экспрессии субъединиц белка *Bdnf* в тканях крыс

Иммуноблоттинг. Образцы гиппокампа и префронтальной коры половозрелых крыс-самцов гомогенизировали с помощью пестика в пластиковых пробирках (объем 1,5мл). Далее к образцам добавляли лизирующий раствор RIPA-буффер. (25 mM Tris-HCl (pH 7,6); 150 mM NaCl; 5 mM ЭДТА; 1 % NP-40; 1 % дезоксихолат натрия; 0,1 % SDS) с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз. Образцы ротировали при 4°C (500 об/мин.) в течение 30 минут. Далее образцы центрифугировали в течение 30 мин. при 2°C (13 000 об /мин.). Супернатанты (тканевые лизаты) собирали в отдельные пробирки (объем 1,5мл). Концентрацию белка в образцах определяли по методу Брэдфорда с помощью набора BCA protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы, содержащие 30 мкг белка, вносили в кассеты с 4 -12 % Bis-Tris NuPAGE гелем (Invitrogen, США). Электрофорез проводили при 4°C в течение 2,5–3 ч с использованием напряжения (80 В) в NuPAGE MOPS SDS буфере (Invitrogen, США). Перенос белков (трансфер) на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в соответствующем буфере (25 mM Трис, метанол (pH 8,3)) при 350 мА в течение 1,5 ч при 4°C. Для блокирования

неспецифических взаимодействий и разведения антител использовали 5% бычий сывороточный альбумин (ПанЭко, Россия). Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали с первичными антителами (Anti-BDNF antibody [EPR1292] (ab108319, Abcam, США); Actin [HRP] (A00730-200, GenScript, США) в течение 16 ч при 4°C. Далее нитроцеллюлозную мембрану инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с HRP (Santa Cruz Biotechnology, США), в течение 1 ч при комнатной температуре. Экспрессию белков определяли с помощью системы визуализации хемилюминесценции Fusion Solo S (Vilber Lourmat, Франция). Эксперимент повторялся 3 раза. Для выражения экспрессии белка в числовых значениях (пикселях) использовалась программа NIH Image J Software Version 1.49 (National Institutes of Health, США).

2.4.4 Биохимический анализ сыворотки крови крыс

Образцы с цельной кровью половозрелых крыс обоего пола центрифугировали при 3000 об/мин. в течение 15 мин при 4°C. Сыворотку переносили в сухие чистые пробирки и хранили до проведения анализа при -20°C не более 5 дней. Измерение необходимых параметров для исследования проводилось на автоматическом биохимическом анализаторе DURUI CS-300B (Китайская Народная Республика (КНР)) после обязательного проведения калибровки и контроля качества исследуемых параметров с заводскими контрольными сыворотками. Проанализированы следующие показатели:

1. Глюкоза, ммоль/л (измерение содержания глюкозы методом с применением глюкооксидазы) (DURUI, (КНР));
2. Холестерин, ммоль/л (ферментативный метод получения общего холестерина) (DURUI (КНР));
3. ЛПНП, ммоль/л (определение холестерина липопротеинов низкой плотности прямым методом) (DURUI (КНР)) [16].

2.5 Статистическая обработка данных эксперимента

Анализ данных поведенческого тестирования выполняли с использованием видеотрекинговой системы «Ethovision^{XT}» фирмы Noldus (Нидерланды) с автоматическим способом анализа треков. Для последующей статистической обработки, в том числе полученных данных после биохимического анализа был использован t-критерий Стьюдента в программе Graph pad Prism 8.0.1. (GraphPad Software, США). Данные представлены как среднее значение (M) ± стандартная ошибка среднего (SEM).

Экспериментальные результаты относительного уровня экспрессии гена *Bdnf* представлены как RQ (Relative Quantity, Lower-Upper Limit). Перед проведением статистического анализа нормальность распределения данных проверялась с помощью теста Шапиро-Уилка. Сравнение значений уровня экспрессии гена между группами проводилась согласно t-критерию Стьюдента в программе Graph pad Prism 8.0.1. (GraphPad Software, США). Для всех видов анализа отличия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Исследование влияния однократного и 14-дневного введения метформина в диапазоне доз на поведенческие характеристики половозрелых мышей-самцов

Экспериментальные исследования проведены на 35 половозрелых мышах-самцах массой 18-25 г в диапазоне доз.

Метформин вводили в двух режимах:

1. Однократно (за 30 минут до проведения поведенческого тестирования в дозах 350 мг/кг, 70 мг/кг и 35 мг/кг в/ж);

2. Многократно, в течение 14 дней в дозах 350 мг/кг, 70 мг/кг и 35 мг/кг в/ж.

Животным из контрольной группы вводили физиологический раствор (0,9% NaCl) в эквивалентном объеме.

Исследуемые группы животных были разделены следующим образом:

1. Метформин 350 мг/кг ($n=7$);

2. Метформин 70 мг/кг ($n=7$);

3. Метформин 35 мг/кг ($n=7$);

4. Феназепам 1 мг/кг ($n=7$);

5. Контроль ($n=7$).

Поведенческое тестирование было проведено как после однократного, так и после 14-дневного введения метформина половозрелым мышам-самцам с применением тестов «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Темно-светлая камера».

В качестве препарата сравнения для исследования анксиолитической активности метформина был использован феназепам (1 мг/кг, в/ж) в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» после однократного и 14-дневного введения.

3.1.1 Изучение влияния метформина на двигательную-исследовательскую активность половозрелых мышей в тесте «Открытое поле»

Результаты исследования влияния метформина на двигательную активность при однократном в/ж введении метформина половозрелым мышам в дозах 350 мг/кг, 70 мг/кг и 35 мг/кг демонстрируют увеличение количества пересеченных линий (двигательной активности) в 1,5, 1,4 и 1,5 раза ($p=0,033$, $p=0,007$ и $p=0,015$) соответственно, по сравнению с контрольной группой животных в тесте «Открытое поле» (рисунок 2 А).

При многократном 14-дневном в/ж введении метформина половозрелым мышам статистически значимых различий обнаружено не было (рисунок 2 Б).

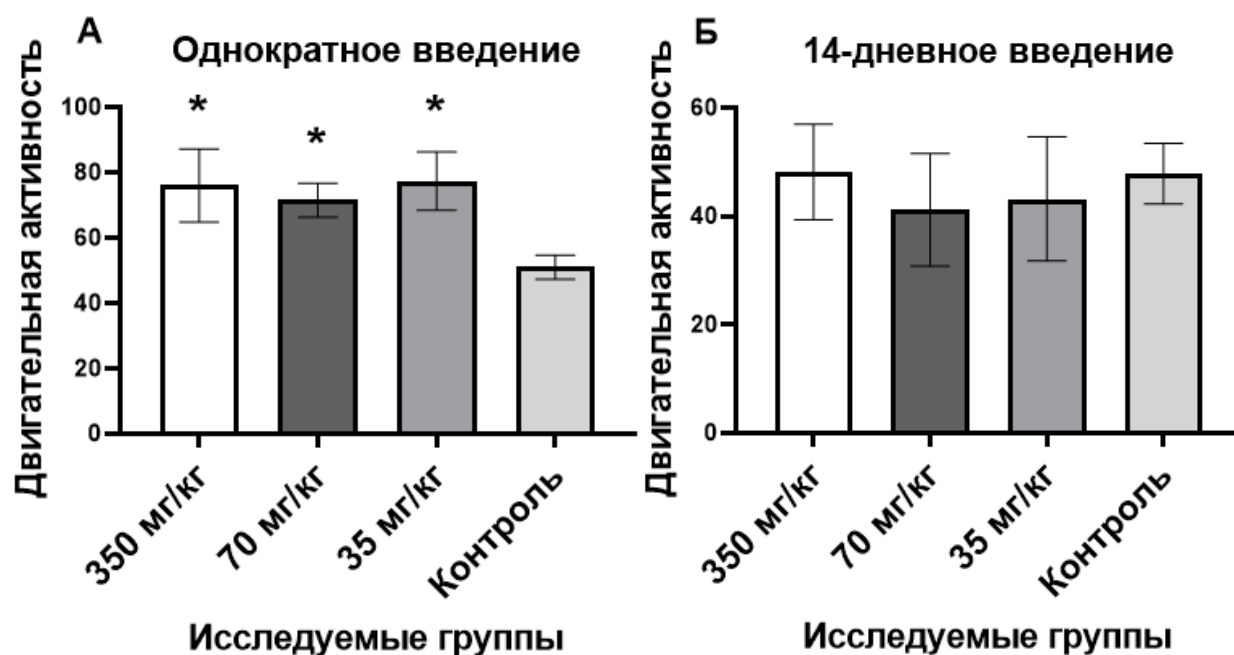


Рисунок 2 – Влияние метформина на двигательную активность половозрелых мышей-самцов в тесте «Открытое поле» при однократном (А) и 14-дневном (Б) внутрижелудочном введении.

Примечание – по оси ординат – количество пересеченных линий по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

При изучении влияния на исследовательскую активность обнаружено, что однократное и 14-дневное введение метформина в дозе 35 мг/кг способствовало снижению регистрируемого показателя, что проявилось уменьшением количества обследованных отверстий (норок) в 1,6 и 1,7 раза ($p=0,049$ и $p=0,031$) по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 3 А,Б)

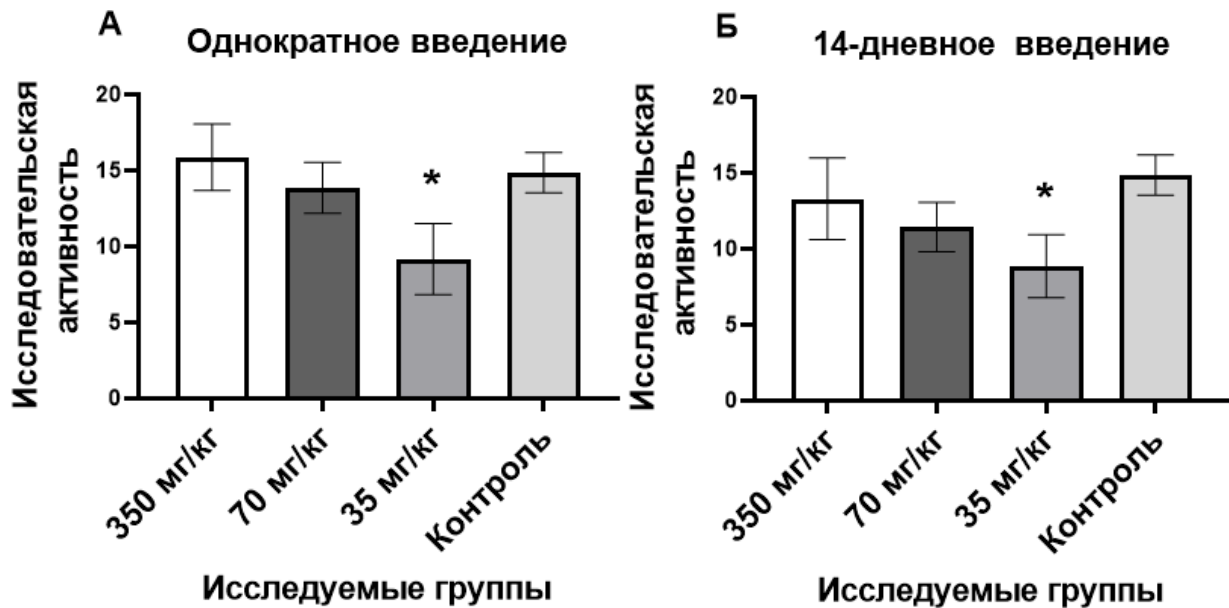


Рисунок 3 – Влияние метформина на исследовательскую активность половозрелых мышей-самцов в тесте «Открытое поле» при однократном (А) и 14-дневном (Б) внутрижелудочном введении.

Примечание – по оси ординат – количество обследованных отверстий по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

3.1.2 Исследование анксиолитического эффекта метформина на половозрелых мышах

При однократном и 14-дневном в/ж введении метформина было отмечено наличие анксиолитического эффекта в дозе 70 мг/кг, что проявлялось увеличением продолжительности пребывания в «открытых» рукавах установки в 5,8 раза

($p=0,012$) и 4,5 раза ($p=0,047$) по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 4 А,Б) в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт».

При многократном 14-дневном применении метформина в дозе 35 мг/кг выявлен аналогичный результат по показателю увеличению продолжительности пребывания в «открытых» рукавах установки в 2,8 раза ($p=0,019$) по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 4 А,Б).

Применение метформина в дозе 350 мг/кг не показало наличие статистически значимых различий при его однократном и 14-дневном введении (рисунок 4 А,Б).

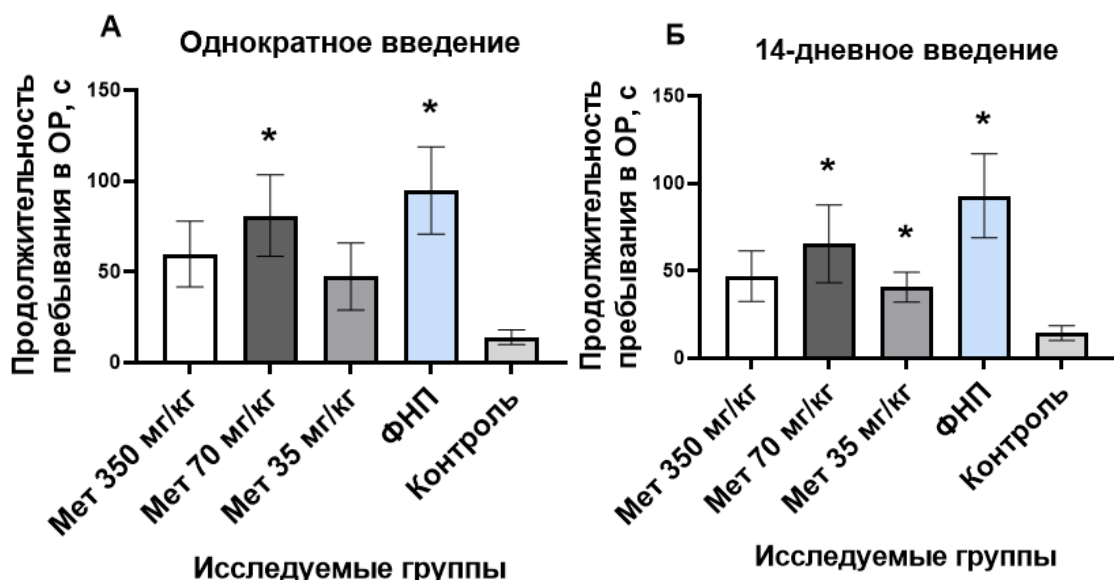


Рисунок 4 – Влияние метформина на тревожность половозрелых мышей-самцов в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в «открытых» рукавах при однократном (А) и 14-дневном (Б) внутрижелудочном введении.

Примечание – по оси ординат – продолжительность пребывания мышей в «открытых» рукавах (ОР) (с) (А, Б) по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных. Мет – метформин, ФНП – феназепам.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

Также, при однократном и 14-дневном в/ж введении метформина в дозе 70 мг/кг наблюдалось анксиолитическое действие по показателю уменьшению продолжительности пребывания в «закрытых» рукавах установки в 1,5 раза

($p=0,001$) и 1,4 раза ($p=0,048$) по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 5 А,Б).

Схожий эффект выявлен при применении метформина в дозе 35 мг/кг, уменьшалась продолжительность пребывания в «закрытых» рукавах установки в 1,4 раза ($p=0,016$) и 1,6 раза ($p=0,033$) как при однократном, так и 14-дневном введении по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 5 А,Б).

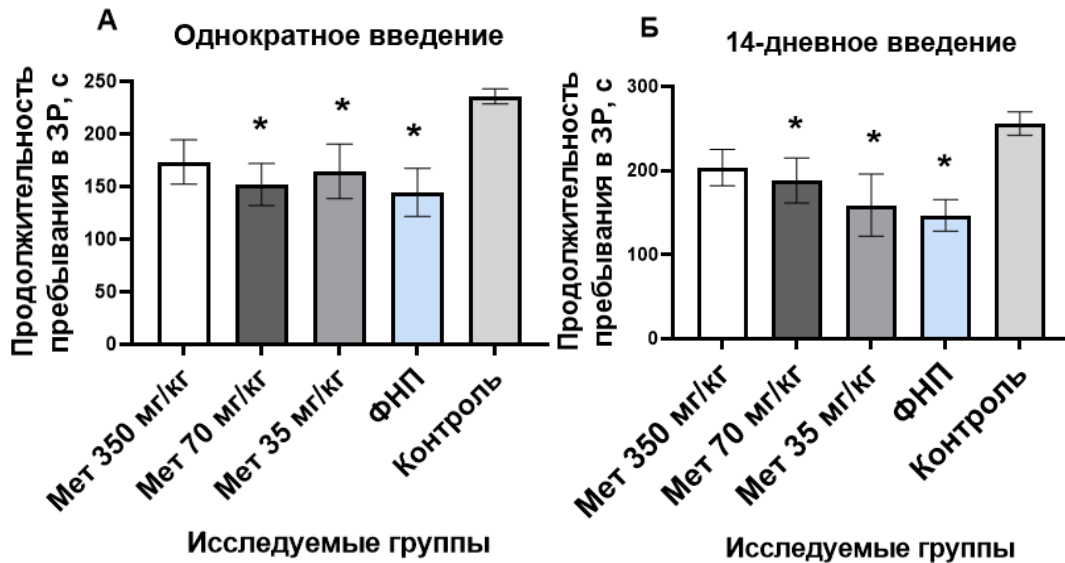


Рисунок 5 – Влияние метформина на тревожность половозрелых мышей-самцов в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в «закрытых» рукавах при однократном (А) и 14-дневном (Б) внутрижелудочном введении.

Примечание – по оси ординат – продолжительность пребывания мышей в «закрытых» рукавах (ЗР) (А, Б) по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных. Мет – метформин, ФНП – феназепам.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

В тесте «Темно-светлая камера» при 14-дневном в/ж введении метформина в дозах 350 мг/кг, 70 мг/кг и 35 мг/кг половозрелым мышам не выявлено статистически значимых отличий от группы контроля (таблица 4).

Таблица 4 – Влияние метформина на тревожность половозрелых мышей-самцов в тесте «Темно-светлая камера» при однократном и 14-дневном внутрижелудочном введении

Мыши-самцы	Время нахождения в светлой камере, с
Однократное в/ж введение	
Метформин 350 мг/кг	236,2±39,32
Метформин 70 мг/кг	260,86±17,96
Метформин 35 мг/кг	269,8±16,45
Контроль	219±33,77
14-дневное в/ж введение	
Метформин 350 мг/кг	253,38±19,04
Метформин 70 мг/кг	243,37±23,69
Метформин 35 мг/кг	250,41±25,62
Контроль	248,91±22,71

3.1.3 Оценка влияния метформина на процессы обучения и памяти половозрелых мышей в тесте «Т-образный лабиринт»

Далее было изучено влияние субтерапевтических доз метформина (70 мг/кг и 35 мг/кг) на процессы обучения и памяти половозрелых мышей в тесте «Т-образный лабиринт». Поведенческое тестирование проводилось после 14-дневного введения метформина в дозах 70 мг/кг и 35 мг/кг. Контрольным животным вводили физиологический раствор (0,9% NaCl) в эквивалентном объеме.

Исследуемые группы животных были разделены следующим образом:

- 1) Метформин 70 мг/кг ($n=7$);
- 2) Метформин 35 мг/кг ($n=7$);
- 3) Контроль ($n=7$).

При анализе влияния 14-дневного в/ж введения метформина в обеих исследуемых дозах (70 мг/кг и 35 мг/кг) на память и процессы обучения было показано, что применение метформина не оказывало влияния на латентный период выбора правильного рукава (таблица 5) в тесте «Т-образный лабиринт».

Таблица 5 – Влияние метформина на процессы обучения и памяти половозрелых мышей-самцов в тесте «Т-образный лабиринт» при 14-дневном внутрижелудочном введении

Мыши-самцы	Латентный период выбора рукава, с
14-дневное в/ж введение	
Метформин 70 мг/кг	35,57±13,44
Метформин 35 мг/кг	12±2,91
Контроль	34,83 ±17,55

3.1.4 Влияние метформина в высокой дозе на двигательную исследовательскую активность половозрелых мышей в тесте «Открытое поле»

Для сравнительного анализа было исследовано влияние метформина в дозе 700 мг/кг на поведенческие характеристики.

Исследования были проведены на 14 половозрелых мышях-самцах массой 18-25 г.

Метформин вводили в двух режимах:

1. Однократно (за 30 минут до проведения поведенческого тестирования в дозе 700 мг/кг в/ж);
2. Многократно, в течение 14 дней в дозе 700 мг/кг в/ж.

Контрольным животным вводили физиологический раствор (0,9% NaCl) в эквивалентном объеме.

Исследуемые группы животных были разделены следующим образом:

1. Метформин 700 мг/кг ($n=7$);
2. Контроль ($n=7$).

Поведенческое тестирование было проведено как после однократного, так и после многократного 14-дневного введения метформина половозрелым мышам-самцам с применением поведенческих тестов, а именно «Открытое поле», «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Темно-светлая камера».

В тесте «Открытое поле» не выявлено статистически значимых отличий от группы контроля при однократном и 14-дневном введении метформина половозрелым мышам в дозе 700 мг/кг (таблица 6).

Таблица 6 – Влияние метформина на двигательную активность половозрелых мышей-самцов в тесте «Открытое поле» при однократном и 14-дневном внутрижелудочном введении в высокой дозе

Мыши-самцы	Двигательная активность
Однократное в/ж введение	
Метформин 700 мг/кг	74,14±15,9
Контроль	87±9,19
14-дневное в/ж введение	
Метформин 700 мг/кг	35±10,62
Контроль	49,14±9,3

Несмотря на отсутствие эффекта на двигательную активность, было отмечено влияние на исследовательскую активность мышей. При однократном введении метформина в дозе 700 мг/кг отмечалось уменьшение исследовательской активности мышей в 2,3 раза ($p=0,001$), а при 14-дневном введении в 2,5 раза ($p=0,004$) по сравнению с контрольной группой животных (таблица 7).

Таблица 7 – Влияние метформина на исследовательскую активность половозрелых мышей-самцов в тесте «Открытое поле» при однократном и 14-дневном внутрижелудочном введении в высокой дозе

Мыши-самцы	Исследовательская активность
Однократное в/ж введение	
Метформин 700 мг/кг	9,86±2,37*
Контроль	22,71±2,17
Множественное 14-дневное в/ж введение	
Метформин 700 мг/кг	8±2,53*
Контроль	20,29±2,42

Примечание – * $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

На основании вышеизложенных результатов были отмечены отличительные аспекты при введении различных доз метформина на поведение животных.

3.1.5 Влияние метформина в высокой дозе на уровень тревожности половозрелых мышей в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Однократное и 14-дневное в/ж введение метформина в дозе 700 мг/кг не оказывало влияние на уровень тревожности мышей в тесте «Открытое поле» (таблицы 8, 9).

Таблица 8 – Влияние метформина на тревожность половозрелых мышей-самцов в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в «открытых» рукавах при 14-дневном внутрижелудочном введении в высокой дозе

Мыши-самцы	Продолжительность пребывания в ОР, с
Однократное в/ж введение	
Метформин 700 мг/кг	50,66±9,49
Контроль	55,24±13,8
14-дневное в/ж введение	
Метформин 700 мг/кг	36,86±13,49
Контроль	48,43±13,01

Примечание – ОР – «открытые» рукава

Таблица 9 – Влияние метформина на тревожность половозрелых мышей-самцов в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в «закрытых» рукавах при 14-дневном внутрижелудочном введении в высокой дозе

Мыши-самцы	Продолжительность пребывания в ЗР, с
Однократное в/ж введение	
Метформин 700 мг/кг	137,44±25,96
Контроль	157,31±21,67
14-дневное в/ж введение	
Метформин 700 мг/кг	148,11±19,04
Контроль	158,68±30,47

Примечание – ЗР – «закрытые» рукава

3.2 Исследование влияния 30-дневного введения метформина на процессы обучения и памяти, когнитивные функции и относительный уровень экспрессии гена *Bdnf* половозрелых крыс-самцов

Экспериментальное исследование проведено на 24 половозрелых крысах-самцах массой 180-200 г.

Метформин вводили многократно, в течение 30 дней в дозах 70 мг/кг и 35 мг/кг в/ж. Контрольным животным вводили физиологический раствор (0,9% NaCl) в эквивалентном объеме.

Исследуемые группы животных были разделены следующим образом:

1. Метформин 70 мг/кг ($n=8$);
2. Метформин 35 мг/кг ($n=8$);
3. Контроль ($n=8$).

После 30-дневного введения метформина было проведено поведенческое тестирование на установках: «Т-образный лабиринт» и «Водный лабиринт Морриса».

После проведения поведенческого тестирования была проведена декапитация животных с помощью гильотины (ООО «НПК Открытая Наука», Россия) и произведен забор структур головного мозга половозрелых крыс (гиппокамп, префронтальная кора) для исследования влияния метформина на относительный уровень экспрессии нейротрофического фактора *Bdnf* и субъединиц соответствующего белка в структурах мозга крыс.

3.2.1 Оценка влияния метформина на процессы обучения и памяти половозрелых крыс в тесте «Т-образный лабиринт»

Обнаружено, что 30-дневное в/ж введение метформина в дозах 70 мг/кг и 35 мг/кг уменьшало латентный период выбора правильного рукава в 4,3 и 5,4 раза ($p=0,046$ и $p=0,023$) по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 6) [117]. Полученные результаты свидетельствуют об улучшении процессов обучения и памяти крыс.

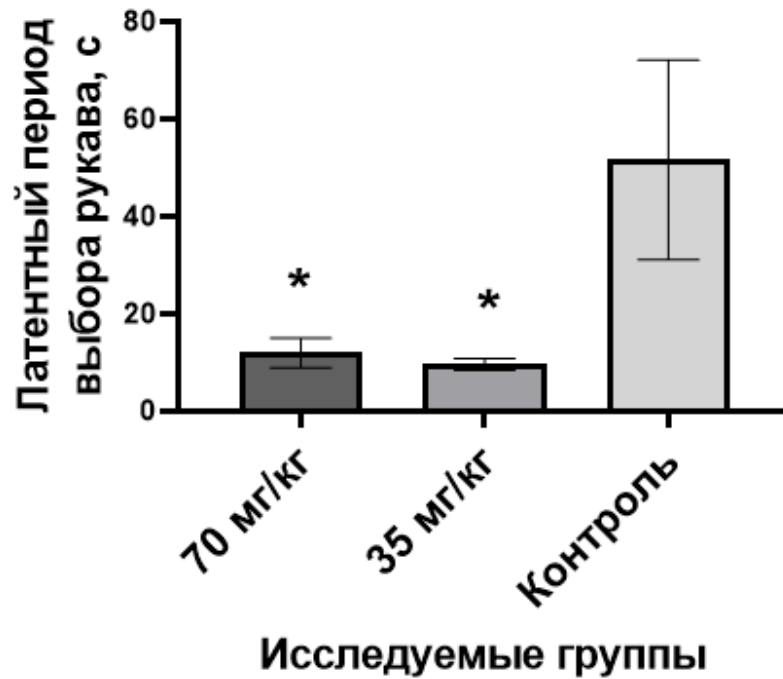


Рисунок 6 – Влияние метформина на процессы обучения и памяти половозрелых крыс-самцов в тесте «Т-образный лабиринт» при 30-дневном внутрижелудочном введении.

Примечание – по оси ординат – латентный период выбора рукава (с) по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

3.2.2 Исследование влияния метформина на пространственную память половозрелых крыс в тесте «Водный лабиринт Морриса»

30-дневное в/ж введение метформина в обеих исследуемых дозах (70 мг/кг и 35 мг/кг) не оказывало влияние на длительность поиска платформы в тесте «Водный лабиринт Морриса» по сравнению с контрольной группой животных (таблица 10) [117].

Таблица 10 – Влияние метформина на пространственную память половозрелых крыс-самцов в тесте «Водный лабиринт Морриса» при 30-дневном внутрижелудочном введении

Крысы-самцы	Длительность поиска платформы, с
Метформин 70 мг/кг	38,38±12,18
Метформин 35 мг/кг	35,25±12,62
Контроль	15,55±5,73

3.2.3 Исследование влияния метформина на уровень экспрессии гена *Bdnf* в структурах головного мозга половозрелых крыс

Результаты исследования продемонстрировали, что в гиппокампе у половозрелых крыс-самцов при в/ж введении метформина относительный уровень экспрессии гена *Bdnf* был увеличен в обеих исследуемых дозах по сравнению с контрольной группой животных, в 1,34 раза ($p=0,029$) в дозе 70 мг/кг и в 1,28 раз ($p=0,04$) в дозе 35 мг/кг (рисунок 7 А). В префронтальной коре половозрелых крыс-самцов относительный уровень экспрессии гена *Bdnf* был увеличен при в/ж введении метформина только в дозе 35 мг/кг в 1,8 раза ($p=0,034$) по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 7 Б) (приложение 1).

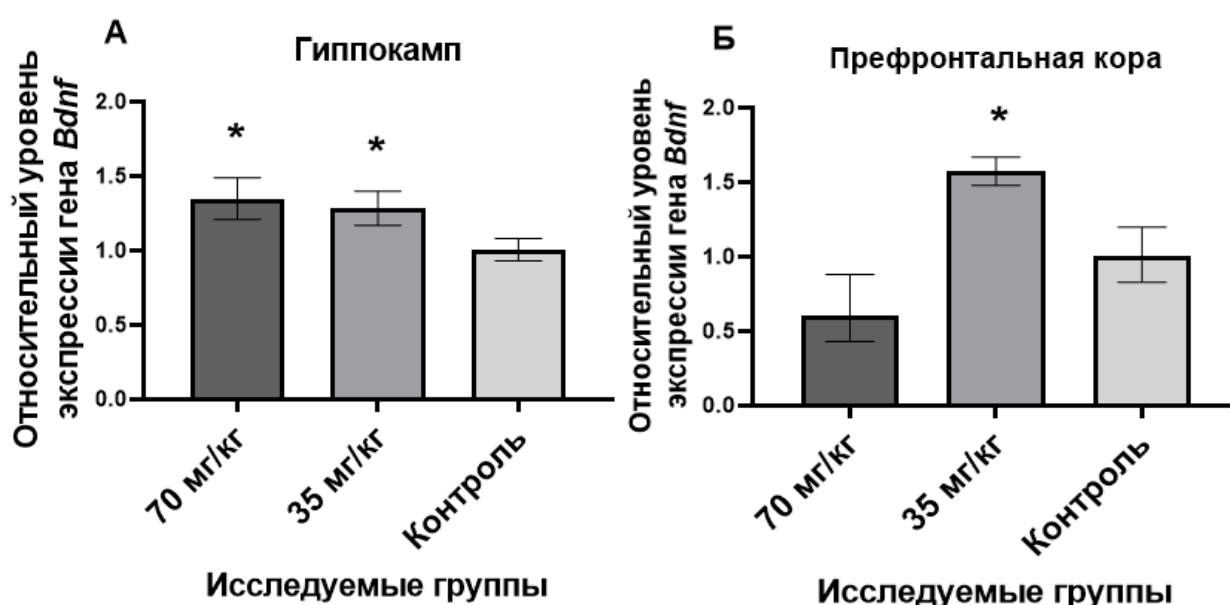


Рисунок 7 – Влияние метформина на относительный уровень экспрессии гена *Bdnf* половозрелых крыс-самцов после 30-дневного внутрижелудочного введения.

Примечание – по оси ординат – относительный уровень экспрессии гена *Bdnf* в гиппокампе (А) и префронтальной коре (Б) половозрелых крыс-самцов по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

Далее был проведен анализ уровня субъединиц белка *Bdnf*. Показано, что применение метформина в дозе 35 мг/кг способствует образованию субъединиц белка *Bdnf* в гиппокампе и префронтальной коре половозрелых крыс-самцов для подтверждения эффективности экспрессии. Результаты представлены в приложении 2, приложении 3.

3.2.4 Исследование влияния метформина на когнитивные функции и уровень тревожности половозрелых крыс

Экспериментальные исследования проведены на 24 половозрелых крысах-самцах массой 180-200 г.

Метформин вводили многократно, в течение 30 дней в дозах 70 мг/кг и 35 мг/кг в/ж. Контрольным животным вводили физиологический раствор (0,9% NaCl) в эквивалентном объеме.

Исследуемые группы животных были разделены следующим образом:

1. Метформин 70 мг/кг ($n=8$);
2. Метформин 35 мг/кг ($n=8$);
3. Контроль ($n=8$).

Исследование анксиолитической активности метформина проводили с применением следующих методов поведенческого тестирования: «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Экстраполяционное избавление». Оценку влияния метформина на когнитивные функции в условиях острого стресса проводили при помощи теста «Экстраполяционное избавление».

3.2.4.1 Анксиолитическое действие метформина в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

30-дневное в/ж введение метформина половозрелым крысам в дозе 70 мг/кг увеличивало продолжительность пребывания в «открытых» рукавах установки в 3,0 раза ($p=0,01$) по сравнению с контрольной группой животных, что свидетельствует о развитии анксиолитического эффекта у крыс (рисунок 8 А).

Отмечалось сокращение продолжительности пребывания в закрытых частях установки при введении метформина в обеих исследуемых дозах (70 мг/кг и 35 мг/кг) в 1,28 раза ($p=0,0001$) и 1,3 раза ($p=0,032$) по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 8 Б).

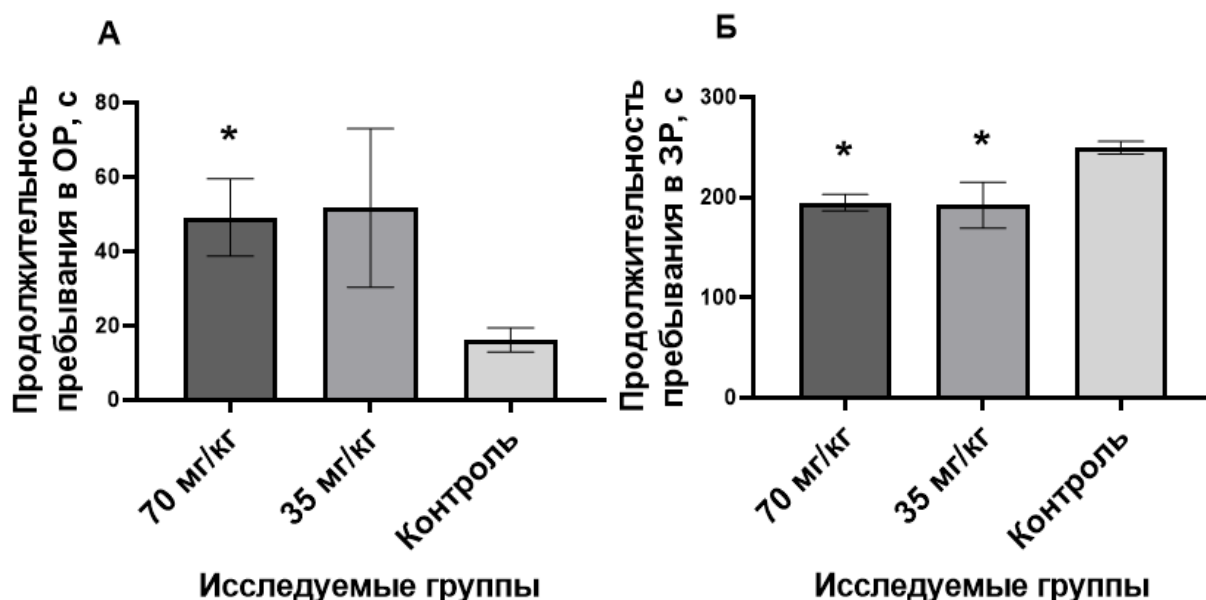


Рисунок 8 – Влияние метформина на уровень тревожности половозрелых крыс-самцов в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» при 30-дневном внутрижелудочном введении.

Примечание – по оси ординат – продолжительность пребывания в «открытых» рукавах (ОР) (А) и «закрытых» рукавах (ЗР) (Б) (с) по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

3.2.4.2 Оценка влияния метформина на тревожность и когнитивные функции половозрелых крыс в условиях острого стресса в тесте «Экстраполяционное избавление»

30-дневное введение метформина в дозах 70 мг/кг и 35 мг/кг показало уменьшение продолжительности периода прыжков в 2,8 и 3,9 раза ($p=0,038$ и $p=0,036$) по сравнению с контрольной группой животных в тесте «Экстраполяционное избавление» (рисунок 9). Результаты демонстрируют, что введение метформина уменьшало состояние тревожности крыс в острых стрессогенных условиях.

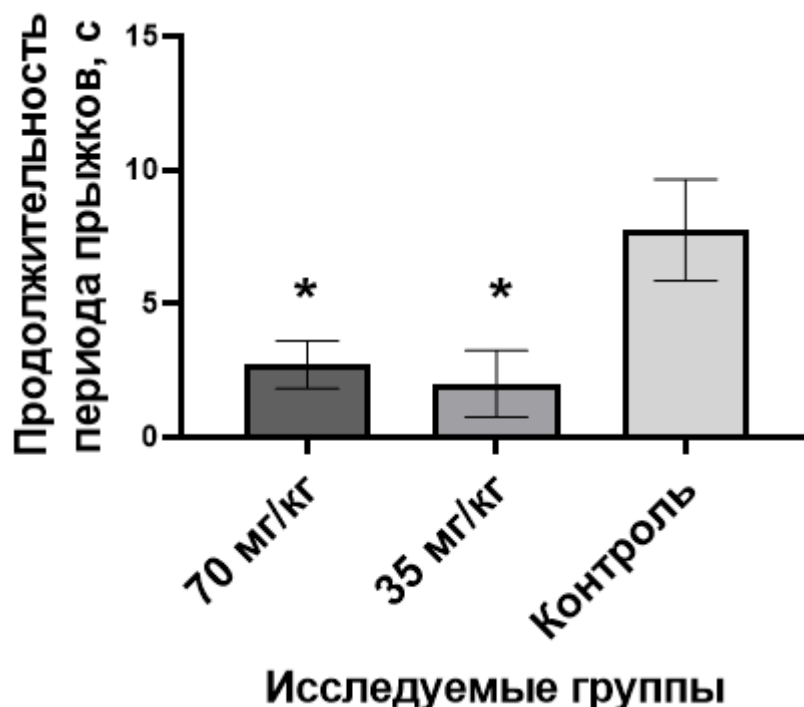


Рисунок 9 – Влияние метформина на тревожность половозрелых крыс-самцов в тесте «Экстраполяционное избавление» при 30-дневном внутрижелудочном введении.

Примечание – по оси ординат – продолжительность периода прыжков (с) по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

Показано влияние метформина на когнитивные функции в стрессогенных условиях при 30-дневном введении в дозе 70 мг/кг, что выражалось в уменьшении латентного периода подныривания под край цилиндра в 3,3 раза ($p=0,047$) по сравнению с контрольной группой животных в тесте «Экстраполяционное избавление» (рисунок 10).

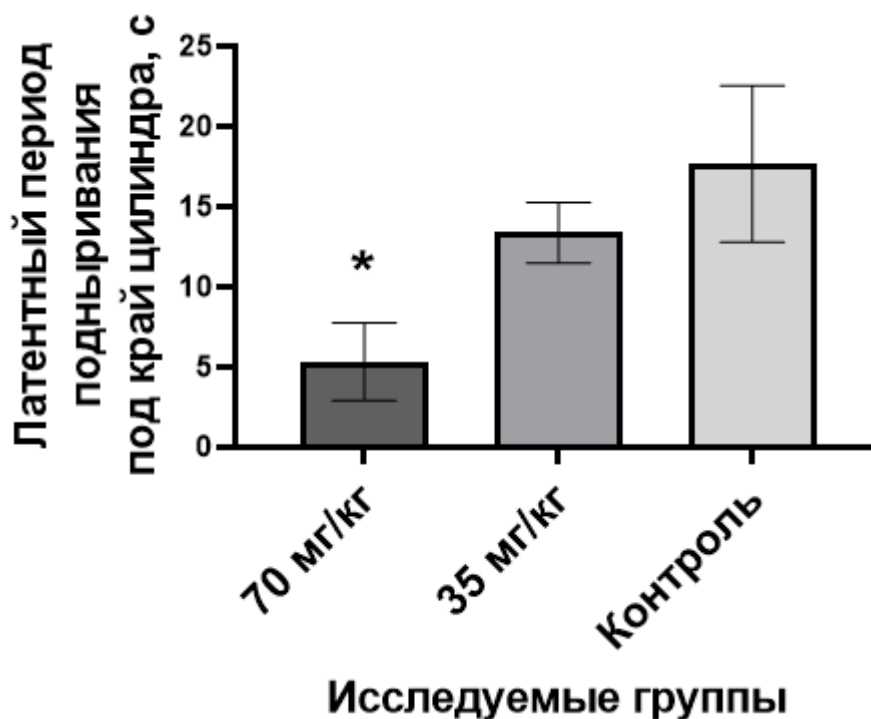


Рисунок 10 – Влияние метформина на когнитивные функции половозрелых крыс-самцов в тесте «Экстраполяционное избавление» при 30-дневном внутрижелудочном введении.

Примечание – по оси ординат – латентный период подныривания под край цилиндра (с) по отношению к контролю; по оси абсцисс - исследуемые группы животных.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

3.3 Исследование влияния 30-дневного введения метформина на физическую активность половозрелых крыс обоего пола

Экспериментальные исследования проведены на 24 половозрелых крысах-самцах массой 180-200 г и 24 половозрелых крысах-самках массой 150-180 г.

Метформин вводили многократно, в течение 30 дней в дозах 70 мг/кг и 35 мг/кг в/ж. Контрольным животным вводили физиологический раствор (0,9% NaCl) в эквивалентном объеме.

Исследуемые группы животных были разделены следующим образом:

- | | | |
|----------------------------------|---|-------------|
| 1. Метформин 70 мг/кг ($n=8$); | } | Крысы-самцы |
| 2. Метформин 35 мг/кг ($n=8$); | | |
| 3. Контроль ($n=8$); | | |
| 4. Метформин 70 мг/кг ($n=8$); | } | Крысы-самки |
| 5. Метформин 35 мг/кг ($n=8$); | | |
| 6. Контроль ($n=8$). | | |

После 30-дневного в/ж введения метформина было проведено исследование с применением комплекса «Ротарод» (для исследования мышечной выносливости крыс). Локомоторную активность крыс изучали с применением теста «Водный лабиринт Морриса».

После тестирования осуществляли декапитацию животных с помощью гильотины (ООО «НПК Открытая Наука», Россия) и производили забор цельной крови из магистральных сосудов шеи для последующего биохимического анализа сыворотки крови половозрелых крыс обоего пола в вакутейнер с активатором свертывания.

3.3.1 Исследование мышечной выносливости половозрелых крыс в комплексе «Ротарод» при введении метформина

Показано, что введение метформина в дозе 70 мг/кг увеличивало время удержания на вращающемся стержне в 4,0 раза ($p=0,007$) у половозрелых крыс по сравнению с контрольной группой животных в комплексе «Ротарод» (рисунок 11 А), что говорит об улучшении мышечной выносливости крыс-самцов. У крыс-

самок влияния метформина на мышечную активность не обнаружено (рисунок 11 Б).

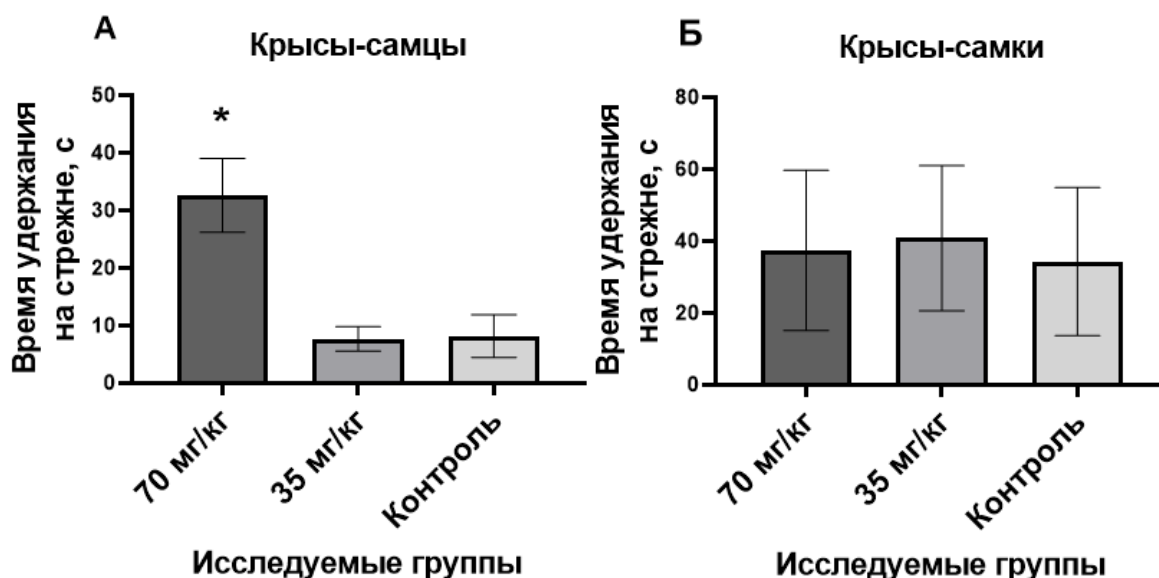


Рисунок 11 – Влияние метформина на мышечную выносливость половозрелых крыс обоего пола в комплексе «Ротарод» при 30-дневном внутрижелудочном введении.

Примечание – по оси ординат – время удержания на вращающемся стержне (с) крыс-самцов (А) и крыс-самок (Б) по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

3.3.2 Исследование локомоторной активности половозрелых крыс в тесте «Водный лабиринт Морриса» при введении метформина

Выявлено, что 30-дневное в/ж введение метформина дозе 35 мг/кг уменьшало скорость плавания у половозрелых крыс-самцов в 2,0 раза ($p=0,011$) в тесте «Водный лабиринт Морриса» по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 12 А). У крыс-самок статистически значимых отличий от группы контроля не обнаружено (рисунок 12 Б).

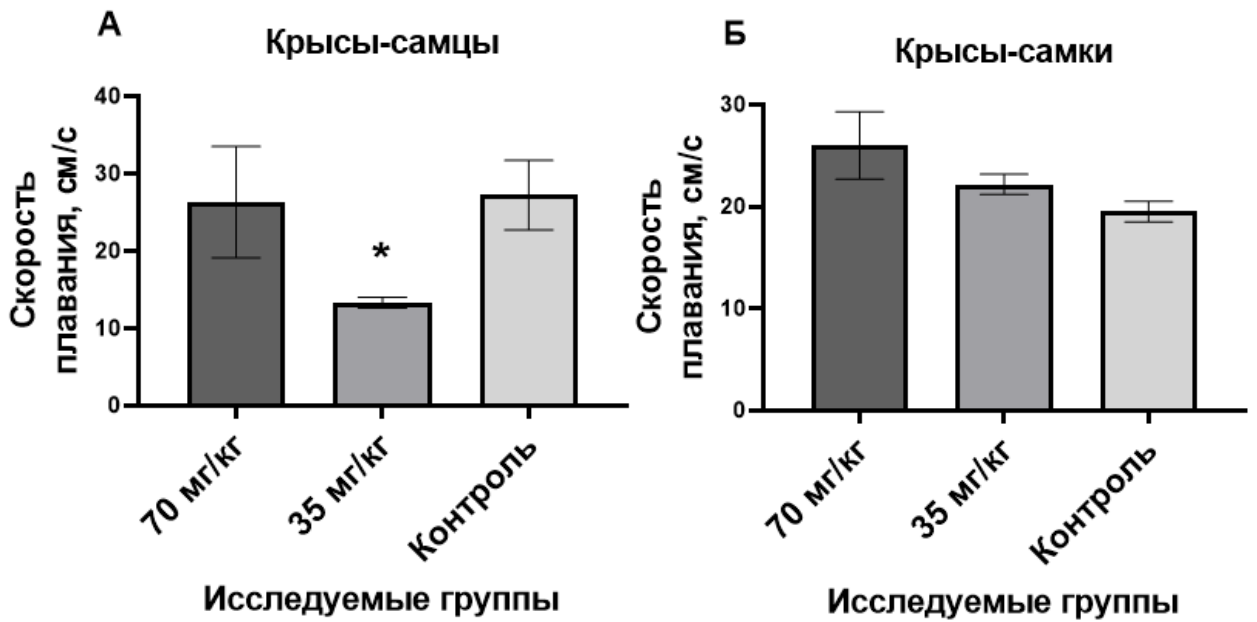


Рисунок 12 – Влияние метформина на двигательную функцию половозрелых крыс обоего пола в тесте «Водный лабиринт Морриса» при 30-дневном внутрижелудочном введении.

Примечание – по оси ординат – скорость плавания (см/с) крыс-самцов (А) и крыс-самок (Б) по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

Отмечено, что 30-дневное в/ж введение метформина в дозе 35 мг/кг способствовало уменьшению пройденного пути у крыс-самцов в 3,0 раза ($p=0,041$) в тесте «Водный лабиринт Морриса» по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 13 А). У крыс-самок отмечалось увеличение пройденного пути при применении метформина в дозе 35 мг/кг в 3,5 раза ($p=0,033$) по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 13 Б)

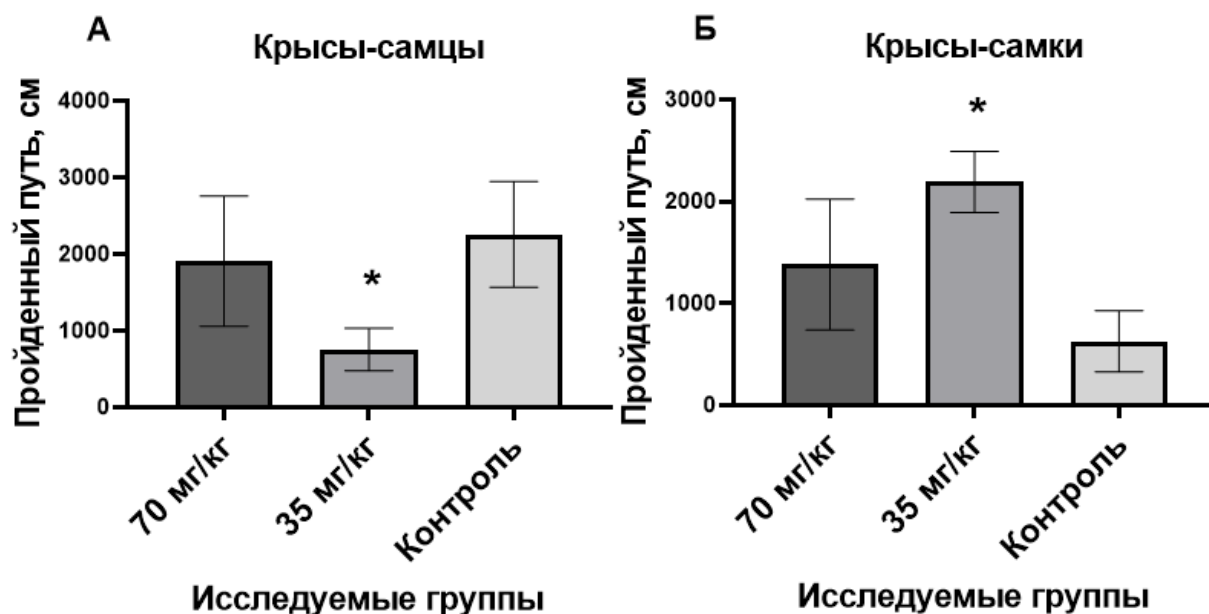


Рисунок 13 – Влияние метформина на локомоторную активность половозрелых крыс обоего пола в тесте «Водный лабиринт Морриса» при 30-дневном внутрижелудочном введении.

Примечание – по оси ординат – пройденный путь (см) крыс-самцов (А) и крыс-самок (Б) по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

3.3.3 Исследование влияния метформина на биохимические показатели сыворотки крови половозрелых крыс

Результаты биохимического анализа показали, что 30-дневное в/ж введение метформина в субтерапевтических дозах, а именно 70 мг/кг и 35 мг/кг не выявило изменения уровня глюкозы у половозрелых крыс обоего пола (приложение 4). Учитывая, что метформин снижает уровень ЛПНП у пациентов с СД 2-го типа [87], было изучено его влияние на уровень ЛПНП половозрелых крыс обоего пола. При этом обнаружено, что происходило уменьшение уровня ЛПНП в обеих исследуемых дозах (70 мг/кг и 35 мг/кг) в 1,2 и 1,3 раза ($p=0,016$ и $p=0,044$) по сравнению с контрольной группой животных у крыс-самок (приложение 4), без изменения уровня холестерина.

3.4 Исследование влияния 30-дневного интраназального введения метформина на процессы обучения и памяти, когнитивные функции и экспрессию гена *Bdnf* половозрелых крыс-самцов

Экспериментальное исследование проведено на 16 половозрелых крысах-самцах массой 180-200 г.

Метформин вводили многократно, в течение 30 дней в дозе 70 мг/кг. Контрольным животным вводили физиологический раствор (0,9% NaCl) в эквивалентном объеме.

Исследуемые группы животных были разделены следующим образом:

1. Метформин 70 мг/кг ($n=8$);
2. Контроль ($n=8$).

После многократного 30-дневного и/н введения метформина было проведено поведенческое тестирование на установках: «Т-образный лабиринт» и «Водный лабиринт Морриса». После проведения поведенческого тестирования была проведена декапитация животных с применением гильотины (ООО «НПК Открытая Наука», Россия) и произведен забор структур головного мозга крыс (гиппокамп, префронтальная кора) для исследования влияния метформина на относительный уровень экспрессии нейротрофического фактора *Bdnf* и субъединиц белка *Bdnf* в структурах мозга крыс.

3.4.1 Исследование интраназального введения метформина на процессы обучения и памяти половозрелых крыс в тесте «Т-образный лабиринт»

При интраназальном 30-дневном применении метформина происходило уменьшение латентного периода выбора правильного рукава в 5,6 раза ($p=0,021$) по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 14), что свидетельствует об улучшении процессов обучения и памяти крыс.

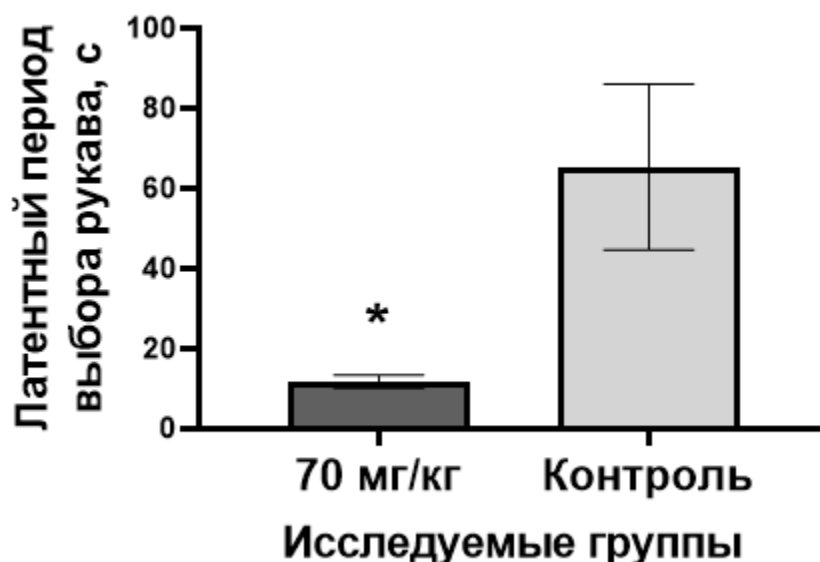


Рисунок 14 – Влияние метформина на процессы обучения и памяти половозрелых крыс-самцов в тесте «Т-образный лабиринт» при 30-дневном интраназальном введении.

Примечание – по оси ординат – латентный период выбора рукава (с); по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

3.4.2 Исследование влияния метформина на пространственную память половозрелых крыс в тесте «Водный лабиринт Морриса»

В тесте «Водный лабиринт Морриса» влияния метформина на пространственную память крыс не обнаружено (таблица 11).

Таблица 11 – Влияние метформина на пространственную память половозрелых крыс-самцов в тесте «Водный лабиринт Морриса» при 30-дневном интраназальном введении

Крысы-самцы	Длительность поиска платформы, с
Метформин 70 мг/кг	40,67±18,17
Контроль	48,14±13,92

3.4.3 Исследование влияния метформина на относительный уровень экспрессии нейротрофического фактора *Bdnf* половозрелых крыс

При интраназальном введении метформина в дозе 70 мг/кг наблюдалась тенденция к увеличению экспрессии гена *Bdnf* в 1,24 раза ($p=0,083$) (рисунок 15 А) по сравнению с контрольной группой животных. В префронтальной коре статистически значимых отличий от группы контроля относительного уровня экспрессии гена *Bdnf* не обнаружено (рисунок 15 Б) (приложение 1).

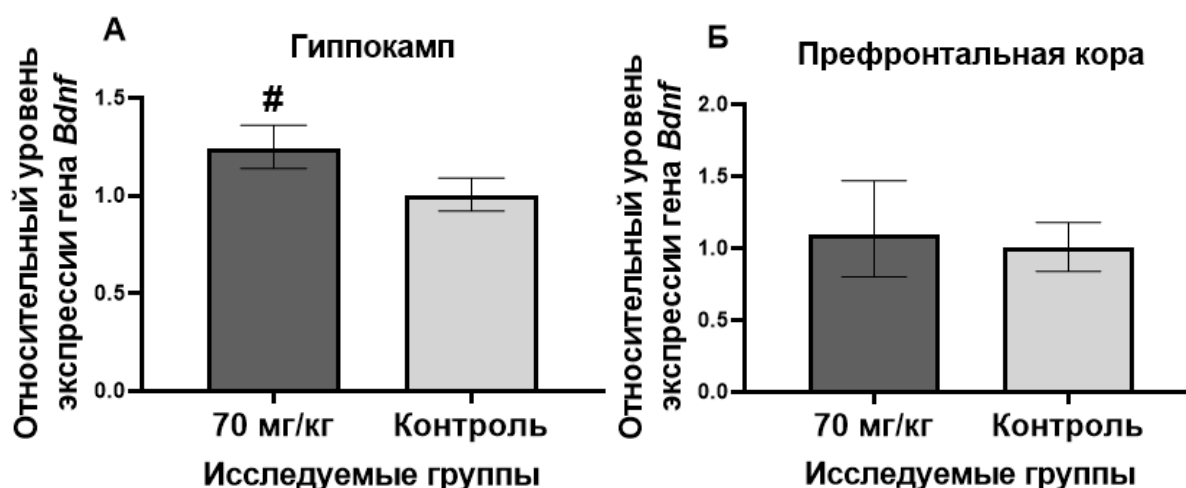


Рисунок 15 – Влияние метформина на относительный уровень экспрессии гена *Bdnf* половозрелых крыс-самцов после 30-дневного интраназального введения.

Примечание – по оси ординат – относительный уровень экспрессии гена *Bdnf* в гиппокампе (А) и префронтальной коре (Б) половозрелых крыс-самцов по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

* $p < 0,1$ – тенденция к достоверности с группой контроля

3.4.4 Исследование влияния метформина на когнитивные функции и уровень тревожности половозрелых крыс

Экспериментальные исследования проведены на 24 половозрелых крысах-самцах массой 180–200 г.

Метформин вводили многократно, в течение 30 дней в дозах 70 мг/кг и 35 мг/кг и/н. Контрольным животным вводили физиологический раствор (0,9% NaCl) в эквивалентном объеме.

Исследуемые группы животных были разделены следующим образом:

1. Метформин 70 мг/кг ($n=8$);
2. Метформин 35 мг/кг ($n=8$);
3. Контроль ($n=8$).

Исследование анксиолитической активности проводили с применением следующих методов поведенческого тестирования: «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Экстраполяционное избавление». Оценку влияния метформина на когнитивные функции в условиях острого стресса проводили при помощи теста «Экстраполяционное избавление».

3.4.4.1 Исследование влияния метформина на когнитивные функции и уровень тревожности половозрелых крыс в тестах «Приподнятый крестообразный лабиринт» и «Экстраполяционное избавление»

При интраназальном применении метформина не наблюдалось развития анксиолитического эффекта в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» (таблицы 12, 13), тем не менее, несмотря на отсутствие эффекта в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт», было отмечено влияние на уровень тревожности в условиях острого стресса в тесте «Экстраполяционное избавление».

Таблица 12 – Влияние метформина на уровень тревожности половозрелых крыс-самцов в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в «открытых» рукавах при 30-дневном интраназальном введении

Крысы-самцы	Продолжительность пребывания в ОР, с
Метформин 70 мг/кг	9,72±3,51
Контроль	34,57±15,15

Примечание – ОР – «открытые» рукава

Таблица 13 – Влияние метформина на уровень тревожности половозрелых крыс-самцов в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в «закрытых» рукавах при 30-дневном интраназальном введении

Крысы-самцы	Продолжительность пребывания в ЗР, с
Метформин 70 мг/кг	241,09±13,76
Контроль	209,6±18,31

Примечание – ЗР – «закрытые» рукава

Показано, что 30-дневное интраназальное введение метформина способствовало развитию анксиолитического эффекта в условиях острого стресса в дозе 70 мг/кг, отмечалось уменьшение продолжительности периода прыжков в раз 5,1 раза ($p=0,02$) по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 16).

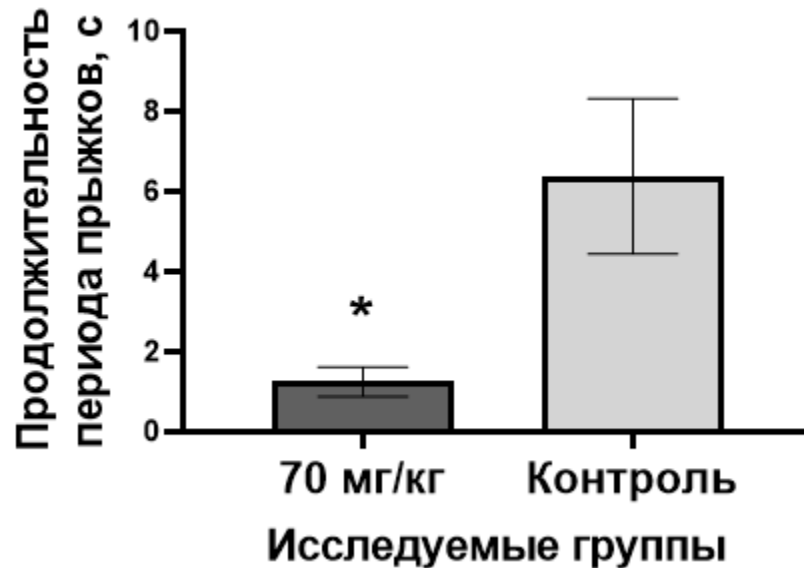


Рисунок 16 – Влияние метформина на тревожность половозрелых крыс-самцов в тесте «Экстраполяционное избавление» при 30-дневном интраназальном введении.

Примечание – по оси ординат – продолжительность периода прыжков (с) по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

Также интраназальное введение метформина способствовало уменьшению латентного периода подныривания под край цилиндра в 1,9 раза ($p=0,041$) по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 17) [117]. Таким образом, выявлено улучшение когнитивных функций крыс в стрессогенных условиях.

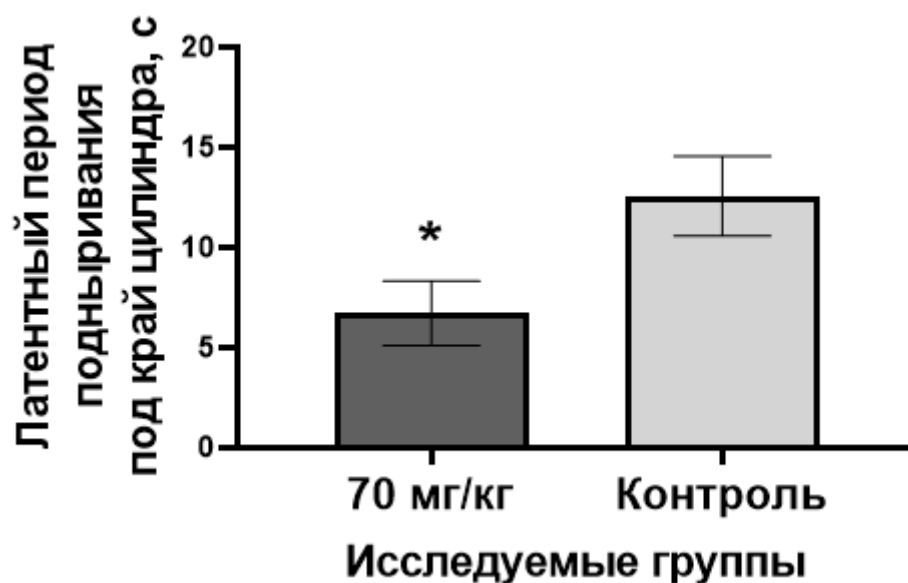


Рисунок 17 – Влияние метформина на когнитивные функции половозрелых крыс-самцов в тесте «Экстраполяционное избавление» при 30-дневном интраназальном введении.

Примечание – по оси ординат – латентный период подныривания под край цилиндра (с) по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

3.5 Исследование эффектов метформина при его 14-дневном введении старым мышам-самцам

Экспериментальное исследование было проведено на 21 старых мышам-самцах массой 45-50 г (возраст – 22 мес.).

Метформин вводили в/ж в дозах 70 мг/кг и 35 мг/кг в течение 14-дней старым мышам-самцам. Контрольным животным вводили физиологический раствор (0,9% NaCl) в эквивалентном объеме.

Исследуемые группы животных были разделены следующим образом:

1. Метформин 70 мг/кг ($n=7$);
2. Метформин 35 мг/кг ($n=7$);
3. Контроль ($n=7$).

После 14-дневного в/ж введения метформина было проведено поведенческое тестирование на установках:

1. «Приподнятый крестообразный лабиринт»;
2. «Т-образный лабиринт».

3.5.1 Исследование влияния метформина на тревожность старых мышей в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

Результаты экспериментов показали наличие анксиолитического эффекта метформина у старых мышей-самцов при его 14-дневном введении в обеих исследуемых дозах (70 мг/кг и 35 мг/кг) в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт».

Так, в/ж введение метформина в дозе 35 мг/кг способствовало увеличению продолжительности пребывания в «открытых» рукавах установки в 5,7 раза ($p=0,02$) и уменьшало продолжительность пребывания в «закрытых» рукавах установки в 1,7 раза ($p=0,001$) по сравнению с контрольной группой животных. Применение метформина в дозе 70 мг/кг оказывало аналогичный эффект, т.е. увеличивалось время пребывания в «открытых» рукавах лабиринта в 5,7 раза ($p=0,001$) раза, по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 18 А, Б).

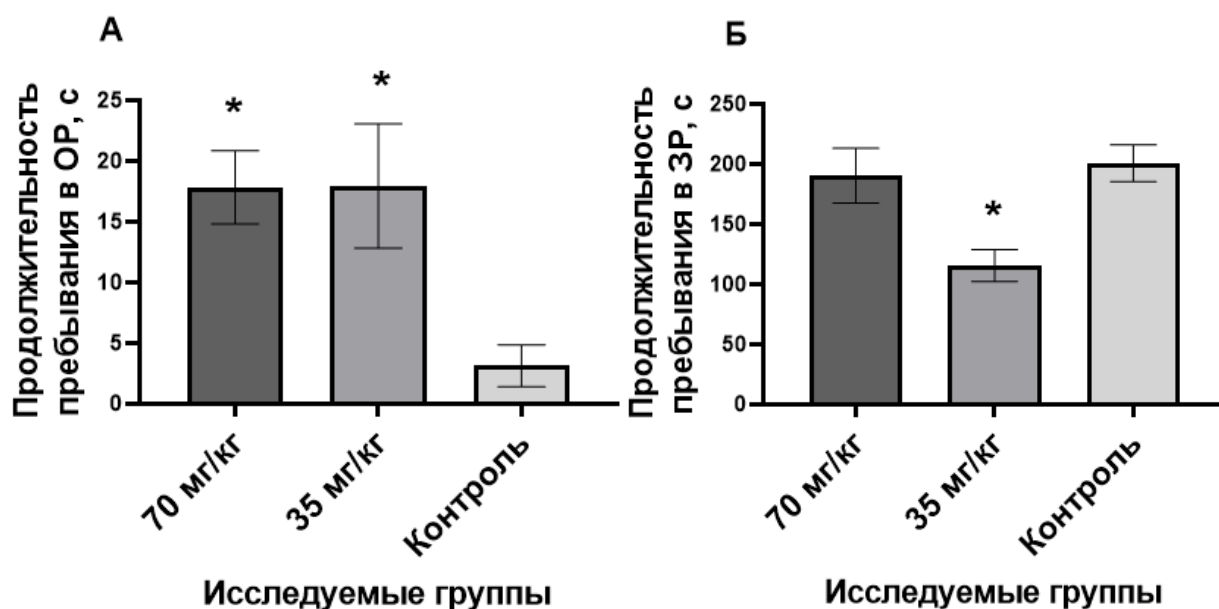


Рисунок 18 – Влияние метформина на тревожность старых мышей-самцов (возраст – 22 мес.) в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» при 14-дневном внутрижелудочном введении.

Примечание – по оси ординат – продолжительность пребывания в «открытых» рукавах (ОР) (А) и «закрытых» рукавах (ЗР) (Б) (с) по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

3.5.2 Исследование влияния метформина на процессы обучения и памяти старых мышей в тесте «Т-образный лабиринт»

Статистически значимых отличий от группы контроля в тесте «Т-образный лабиринт» после 14-дневного в/ж введения метформина в обеих исследуемых дозах (70 мг/кг и 35 мг/кг) старым мышам-самцам не обнаружено (таблица 14).

Таблица 14 – Влияние метформина на процессы обучения и памяти старых мышей-самцов (возраст – 22 мес.) тесте «Т-образный лабиринт» при 14-дневном внутрижелудочном введении

Старые мыши-самцы	Латентный период выбора рукава, с
Метформин 70 мг/кг	27,14±7,87
Метформин 35 мг/кг	29,33±9,84
Контроль	26,5±11,62

3.6 Исследование эффектов метформина при его 30-дневном введении старым крысам обоего пола

Экспериментальное исследование было проведено на 48 старых крысах обоего пола (16 старых крыс-самцов массой 550-600 г и 16 старых крыс-самок массой 250-300 г).

Исследуемые группы животных были разделены следующим образом:

- | | | |
|----------------------------------|---|--------------------|
| 1. Метформин 70 мг/кг ($n=8$); | } | Старые крысы-самцы |
| 2. Метформин 35 мг/кг ($n=8$); | | |
| 3. Контроль ($n=8$); | | |
| 4. Метформин 70 мг/кг ($n=8$); | } | Старые крысы-самки |
| 5. Метформин 35 мг/кг ($n=8$); | | |
| 6. Контроль ($n=8$). | | |

После 30-дневного в/ж введения метформина было проведено поведенческое тестирование на установках:

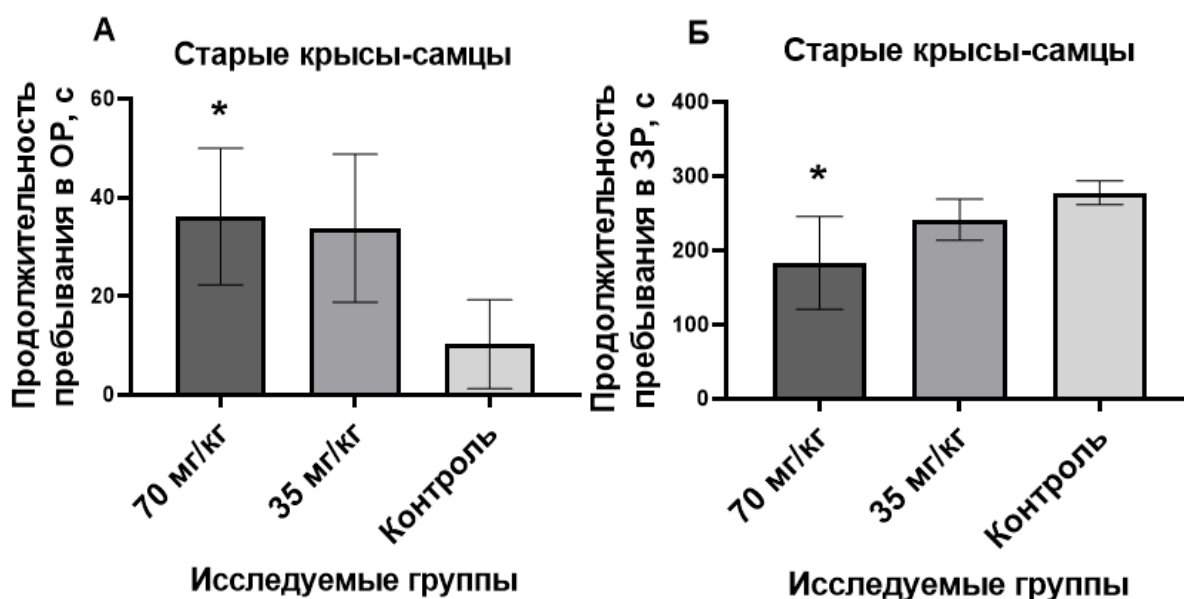
1. «Приподнятый крестообразный лабиринт»;
2. «Водный лабиринт Морриса».

После поведенческого тестирования была проведена декапитация животных с помощью гильотины (ООО «НПК Открытая Наука», Россия) и произведен забор тканей (3 типа структур мозга: префронтальная кора, мозжечок и гиппокамп и 3 типа мышечных волокон: *musculus soleus*, *musculus quadriceps*, *musculus*

gastrocnemius) для исследования влияния метформина на относительный уровень экспрессии нейротрофического фактора *Bdnf*.

3.6.1 Исследование влияния метформина на тревожность старых крыс в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»

30-дневное в/ж введение метформина в дозе 70 мг/кг продемонстрировало наличие анксиолитического эффекта, выявленного в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» у старых крыс-самцов: увеличивалась продолжительность пребывания в «открытых» рукавах в 3,5 раза ($p=0,044$) и уменьшалась продолжительность пребывания в «закрытых» рукавах в 1,5 раза ($p=0,016$) по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 19 А, Б). У старых-крыс самок метформин не продемонстрировал наличие анксиолитического эффекта (рисунок 19 В, Г).



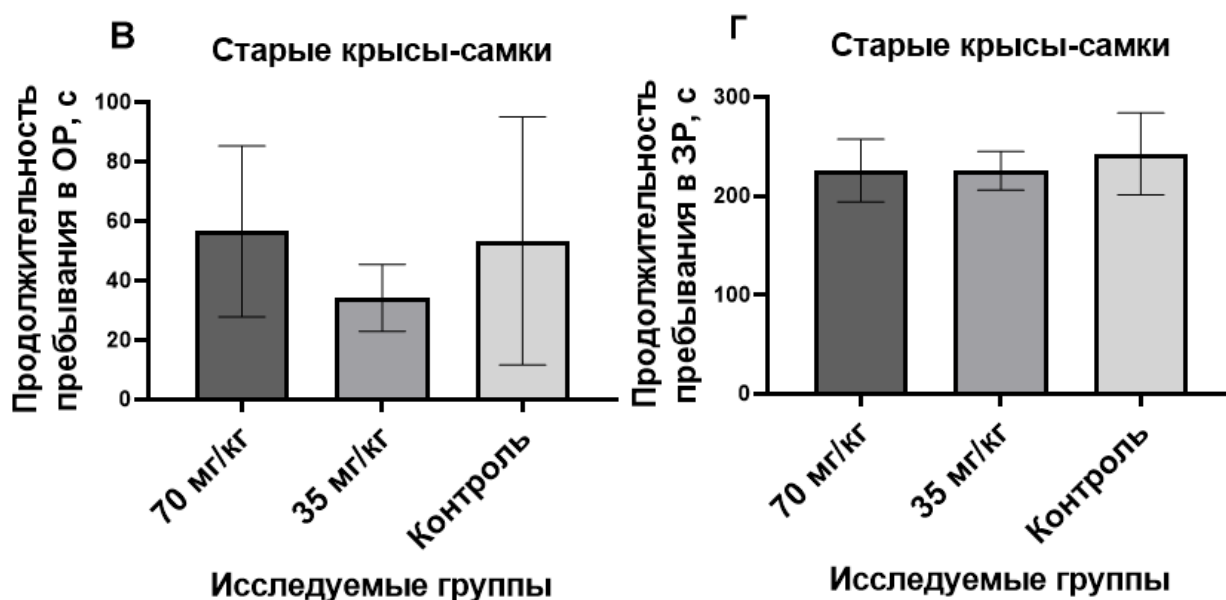


Рисунок 19 – Влияние метформина на тревожность старых крыс обоего пола (возраст – 24 мес.) в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» при 30-дневном внутрижелудочном введении.

Примечание – по оси ординат – продолжительность пребывания в «открытых» рукавах (ОР) (А, В) и «закрытых» рукавах (ЗР) (Б, Г) (с) старых крыс-самцов (А, Б) и крыс-самок (В, Г) по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

3.6.2 Исследование пространственной памяти старых крыс в тесте «Водный лабиринт Морриса» при введении метформина

30-дневное в/ж введение метформина в дозе 70 мг/кг увеличивало длительность нахождения в зоне платформы у старых крыс-самцов в 1,7 раза ($p=0,03$) и в дозе 35 мг/кг в 1,5 раза ($p=0,047$) по сравнению с контрольной группой животных в тесте «Водный лабиринт Морриса» (рисунок 20 А), что показывает улучшение пространственной памяти крыс. У старых крыс-самок статистически значимых отличий от группы контроля не выявлено (рисунок 20 Б).

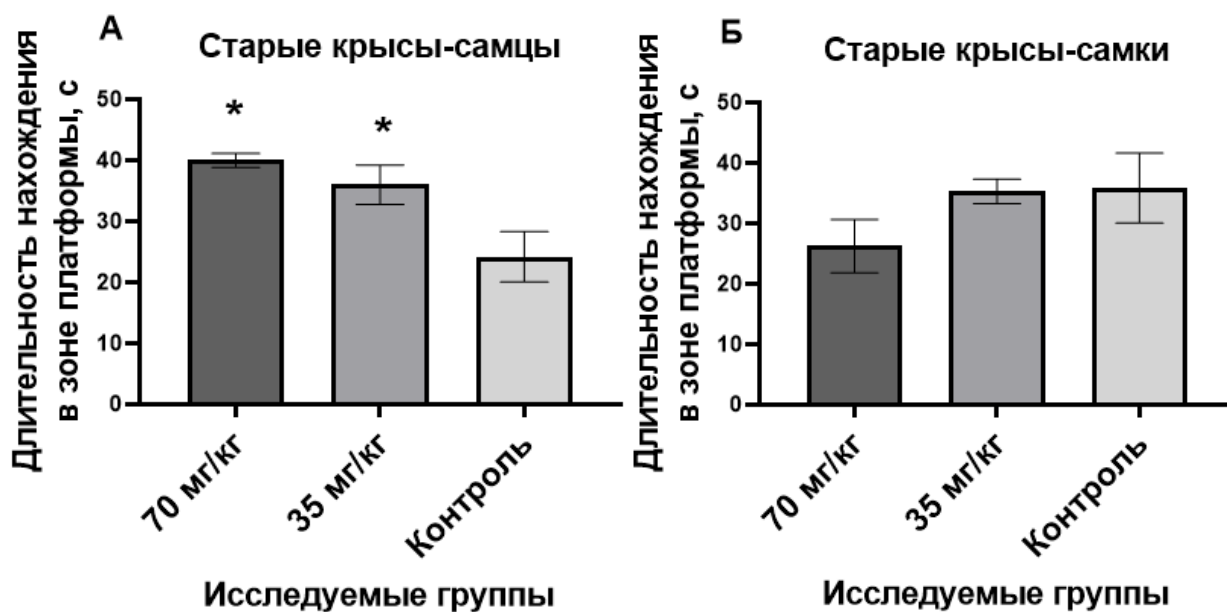


Рисунок 20 – Влияние метформина на пространственную память старых крыс обоего пола (возраст – 24 мес.) в тесте «Водный лабиринт Морриса» при 30-дневном внутрижелудочном введении.

Примечание – по оси ординат – длительность нахождения в зоне платформы старых крыс-самцов (А) и крыс-самок (Б) по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

3.7 Исследование влияния метформина на относительный уровень экспрессии гена *Bdnf* в тканях старых крыс как один из ключевых механизмов действия метформина

Относительный уровень экспрессии гена *Bdnf* был повышен в префронтальной коре в 3,3 раза ($p=0,047$) по сравнению с контрольной группой животных (рисунок 21 А) у старых крыс-самцов после 30-дневного в/ж введения метформина в дозе 35 мг/кг. У старых крыс-самок статистически значимых отличий от группы контроля не обнаружено (рисунок 21 Б).

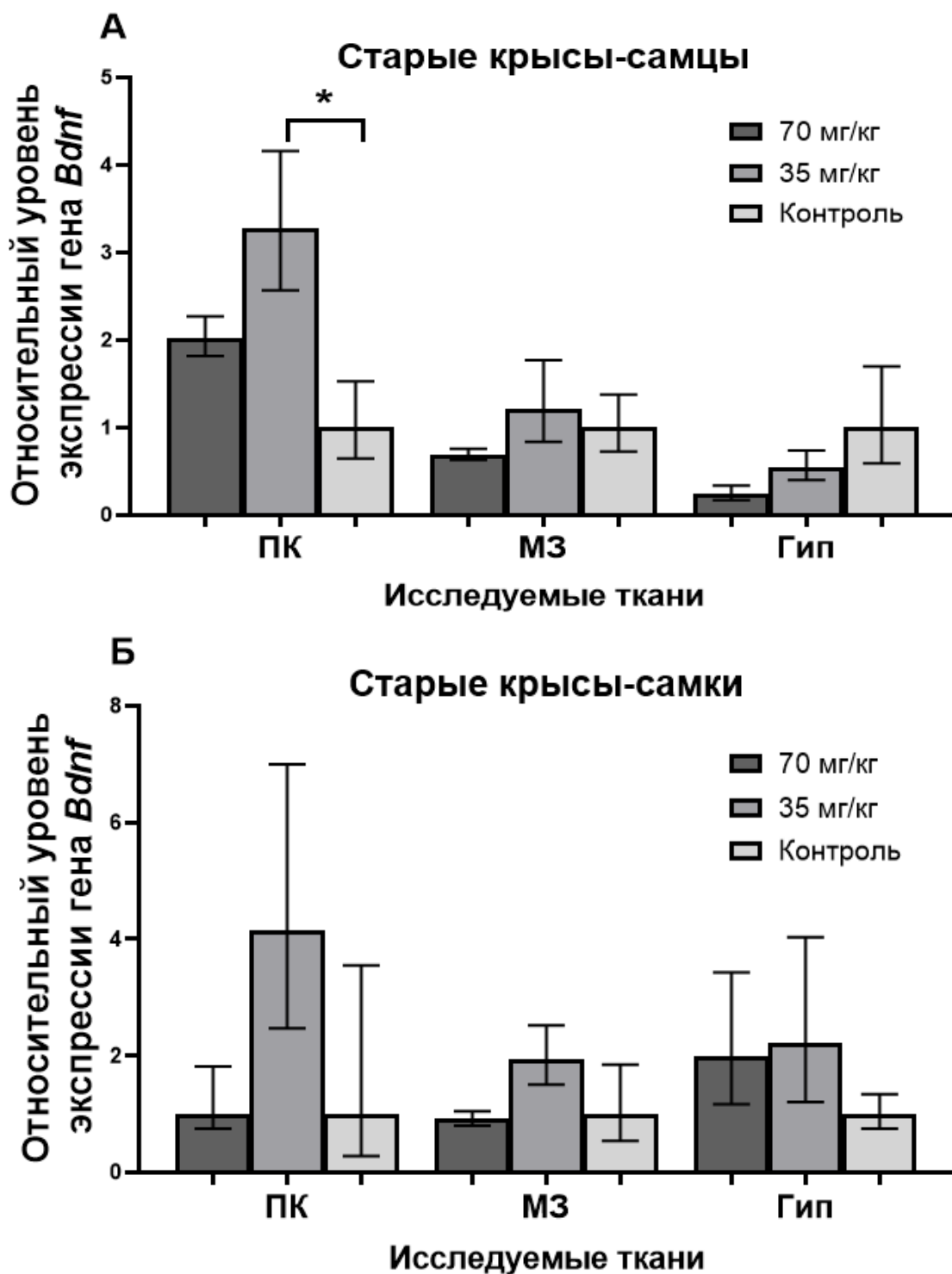


Рисунок 21 – Влияние метформина на относительный уровень экспрессии гена *Bdnf* в структурах мозга старых крыс-обоого пола (возраст – 24 мес.).

Примечание – по оси ординат – относительный уровень экспрессии гена *Bdnf* старых крыс-самцов (А) и крыс-самок (Б) по отношению к контролю; по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

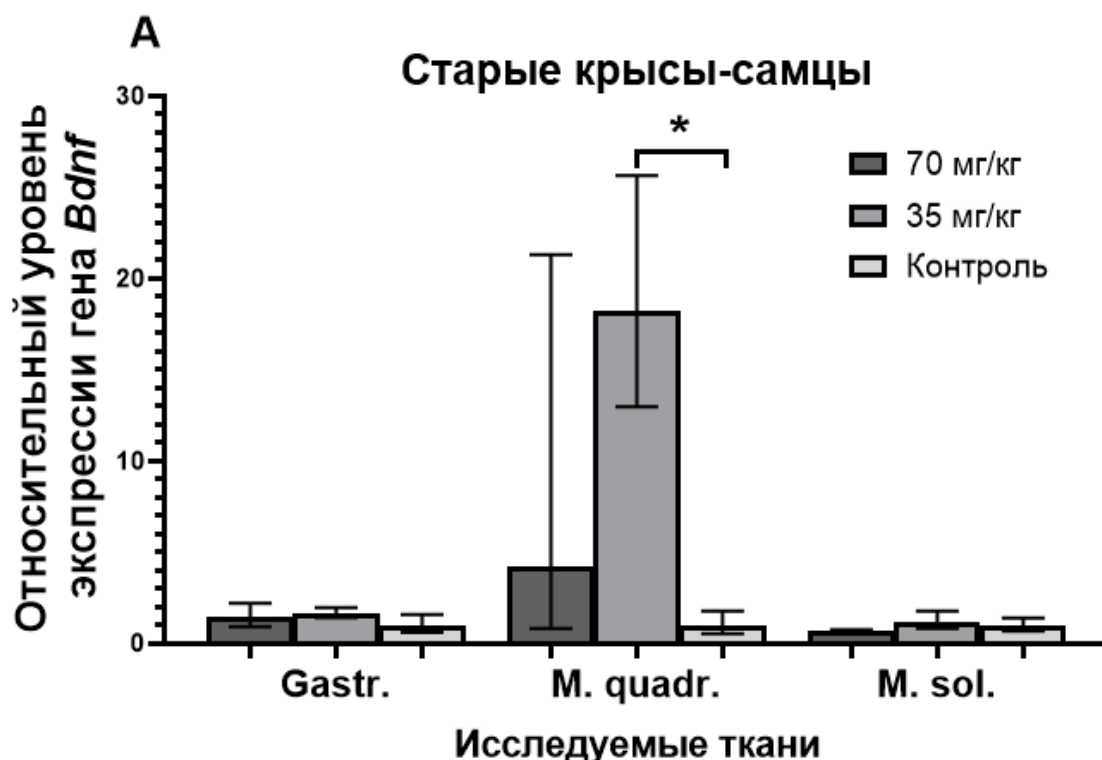
ПК – префронтальная кора, МЗ – мозжечок, Гип – гиппокамп.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

Относительный уровень экспрессии гена *Bdnf* был увеличен в *musculus quadriceps* в 18,0 раз ($p=0,006$) по сравнению с группой контроля (рисунок 22 А) у старых крыс-самцов после 30-дневного в/ж введения метформина в дозе 35 мг/кг. У старых крыс-самок статистически значимых отличий от группы контроля не обнаружено (рисунок 22 Б).

Полученные результаты демонстрируют, что механизмы реализации геропротекторных эффектов метформина различаются у старых крыс-самцов и крыс-самок, что подчеркивает необходимость дальнейших исследований с учетом половой принадлежности.

Данные изменения относительного уровня экспрессии нейротрофического фактора *Bdnf* в тканях старых крыс обоего пола при 30-дневном в/ж введении метформина представлены в приложении 5.



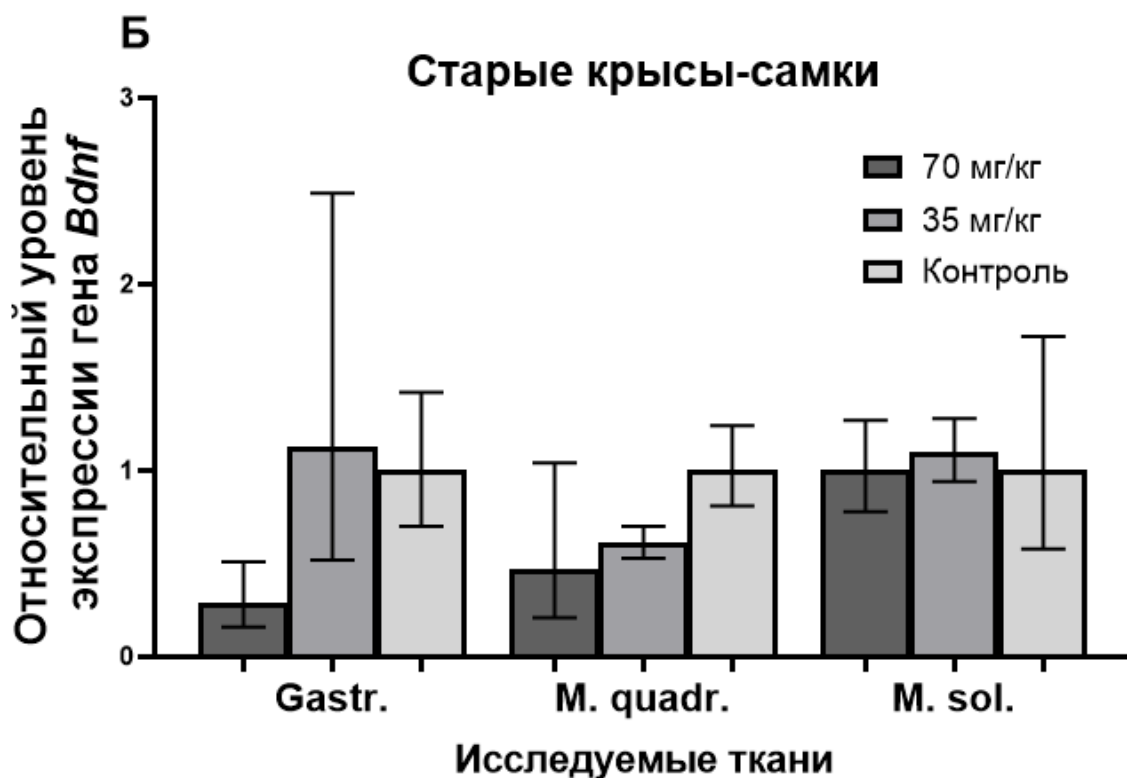


Рисунок 22 – Влияние метформина на относительный уровень экспрессии гена *Bdnf* в мышечных волокнах старых крыс обоего пола.

Примечание – по оси ординат – относительный уровень экспрессии гена *Bdnf* старых крыс-самцов (А) и крыс-самок (Б) по отношению к контролю (А, Б); по оси абсцисс – исследуемые группы животных.

Gastr. – *Gastrocnemius*, M. quadr. – *Musculus quadriceps*, M.sol. – *Musculus soleus*.

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

ГЛАВА 4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе проведено экспериментальное исследование с целью обоснования перспективности применения метформина как потенциального геропротектора.

Учитывая статистические данные, отражающие рост количества людей пожилого возраста во всем мире и в РФ [14, 15, 27] и, соответственно, увеличение доли возраст-ассоциированных заболеваний [87], необходимо разрабатывать стратегию здорового долголетия, включающая в себя поиск лекарственных средств, направленных на замедление процесса физиологического старения и развития возраст-ассоциированных заболеваний.

Процесс старения напрямую влияет на развитие возраст-ассоциированных заболеваний. К ним относят: нейродегенеративные (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и т.д.), сердечно-сосудистые, онкологические заболевания и т.д. [15, 31, 87]. Снижение в процессе физиологического старения когнитивных функций, нарушение процессов обучения и памяти, а также развитие тревожности, вызывает нарушение соматических функций, что приводит к снижению качества жизни, социальной дезадаптации и функциональным ограничениям.

В настоящее время в качестве геропротекторов принято рассматривать лекарственные средства, обладающие доказанной эффективностью и безопасностью, внедренные и применяемые в клинической практике длительный период. Поиск лекарственных средств, обладающих геропротекторными свойствами ведется с целью воздействия на различные звенья патогенеза старения и уменьшения выраженности нарушений, возникающих вследствие биологического старения организма.

Одним из таких кандидатов выступает противодиабетическое средство – метформин [13, 15, 31, 73]. Метформин является одним из наиболее часто применяемых противодиабетических средств для терапии СД 2-го типа [15]. Совокупность нарушений, возникающих в процессе биологического старения организма, требует поиска лекарственного средства, обладающего

мультитаргетным механизмом действия. Метформин может явиться достойным кандидатом, так как его влияние на патогенез старения может быть опосредованно многочисленными механизмами действия, что обуславливает выбор лекарственного средства для проведения исследований и перспективность внедрения в клиническую практику.

Особый интерес вызывает возможное применение метформина в малых (субтерапевтических) дозах, не оказывающих гипогликемического действия, что может способствовать уменьшению побочных эффектов, особенно со стороны ЖКТ. Предполагается, что геропротекторы будут применяться в течение продолжительного периода времени, и в связи с этим, снижение дозы метформина может способствовать потенциальному расширению возможностей для его длительного применения.

Для определения общего направления работы по изысканию эффектов метформина на функции ЦНС были применены разнообразные методы исследований, такие как методы поведенческого тестирования, генетического и биохимического анализов. Метод поведенческого тестирования является широко применяемым в области психофармакологии и фармакологии поведения. Тестирование на поведенческих установках может выполнять прогностическую функцию, с целью скрининга и оценки потенциальной пригодности лекарственного средства для лечения различных заболеваний, кроме того данный метод обладает удобством верификации.

Учитывая индивидуальные и половые различия в протекании процесса физиологического старения у мужчин и женщин, прослеживаются разные эффекты влияния лекарственных средств в зависимости от пола [6]. Один из основных этапов диссертационной работы заключался в исследовании влияния метформина на старых крысах обоего пола в возрасте 24 мес. с учетом половых различий при его многократном 30-дневном в/ж введении в дозах 70 мг/кг и 35 мг/кг и старых мышцах-самцах в возрасте 22 мес. при 14-дневном в/ж введении в дозах 70 мг/кг и 35 мг/кг.

Состояние повышенной тревожности часто является симптомом ряда заболеваний со стороны ЦНС, особенно в процессе старения [12]. В настоящее время анксиолитики являются одной из наиболее применяемых групп для терапии тревожных расстройств. Однако следует понимать, что лекарственные средства данной группы при длительном применении способствуют развитию толерантности, и их безопасность у лиц пожилого возраста вызывает сомнения. Ранее было показано, что метформин в дозе 100 мг/кг способствует развитию анксиолитического эффекта у крыс-самцов [103]. При этом аспект влияния метформина в малых дозах на неврологические расстройства изучен крайне недостаточно. Так, был выявлен анксиолитический эффект метформина в обеих исследуемых дозах (70 мг/кг и 35 мг/кг) у старых мышей-самцов после 14-дневного в/ж введения метформина и у старых крыс-самцов в дозе 70 мг/кг после 30-дневного в/ж введения в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» [139]. Ранее другими исследователями было показано, что развитие анксиолитического эффекта метформина в более высоких дозах может заключаться в регулировании сигнального пути АМФК-ФохО3а, что может приводить к активации транскрипции белка, ассоциированного с рецепторами гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) (GABARAP) в гиппокампе [103]. Таким образом, происходит усиление ГАМК-ергической тормозной передачи. Кроме того, известно, что метформин обладает противовоспалительной активностью [15], снижая уровень цитокинов и воспалительных медиаторов в ЦНС [87], что также может дополнять анксиолитический эффект метформина, поскольку воспаление ассоциируется с развитием тревожного состояния [39]. Возможно, что механизм анксиолитического эффекта метформина в более низких дозах заключается в аналогичном действии. Влияние метформина в малых дозах на вышеперечисленные показатели может приводить к уменьшению тревожно-подобного состояния.

Известно, что гиппокамп является областью мозга, участвующего в пространственном обучении и запоминании [36, 117]. Снижение способности к пространственному обучению может быть связано с изменениями, происходящими в гиппокампе в процессе физиологического старения [36]. Провести оценку

пространственной памяти животных позволяет тест «Водный лабиринт Морриса» [16]. Так, в этом тесте было показано улучшение показателей пространственной памяти у старых крыс-самцов в обеих исследуемых дозах (70 мг/кг и 35 мг/кг) при 30-дневном в/ж введении метформина. Механизмы улучшения пространственной памяти крыс под воздействием метформина по данным литературы и дополненными нашими сведениями в экспериментах может включать комплекс процессов, обусловленных его мультитаргетным механизмом действия, а именно: активацией сигнального пути АМФК [15, 73, 87], противовоспалительным эффектом, заключающийся в снижении нейровоспаления [15, 87], которое напрямую связано с ухудшением когнитивных функций, а также усилением нейропластичности путем активации нейротрофического фактора мозга *Bdnf* в структурах головного мозга крыс [15, 139].

Влияние метформина в малых дозах, не оказывающих гипогликемического действия, на относительный уровень экспрессии нейротрофического фактора *Bdnf* на экспериментальных животных показано в настоящем исследовании, и анализ результатов будет рассмотрен ниже.

Значимый этап исследования основывался на изучении влияния субтерапевтических доз (70 мг/кг и 35 мг/кг) метформина при 30-дневном в/ж введении на процессы обучения и памяти, когнитивные функции и уровень тревожности половозрелых крыс-самцов с применением методов поведенческого тестирования, а также влияния на относительный уровень экспрессии гена *Bdnf* и экспрессию субъединиц белка *Bdnf* в структурах мозга (гиппокамп и префронтальная кора) половозрелых крыс-самцов.

«Т-образный лабиринт» – поведенческий тест, в котором животное в случае нахождения правильного рукава лабиринта, получало вознаграждение в виде еды [16], пищевое подкрепление является стимулом для поиска еды в условиях предшествующей пищевой депривации. Что касается влияния метформина на процессы обучения и памяти, было показано, что в тесте «Т-образный лабиринт» метформин улучшает данные показатели в обеих исследуемых дозах (70 мг/кг и 35 мг/кг) при 30-дневном в/ж введении половозрелым крысам-самцам.

Однако, в отличие от «Т-образного лабиринта», в тесте «Водный лабиринт Морриса», который отличается более стрессогенными условиями, статистически значимых отличий от группы контроля у половозрелых крыс-самцов обнаружено не было. Здесь нельзя исключить вероятность влияния стрессирующего фактора – воды.

При исследовании уровня тревожности половозрелых крыс-самцов в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» выявлен аналогичный эффект, который был получен на старых животных. Так, показано что метформин в малых дозах (70 мг/кг и 35 мг/кг) оказывает анксиолитическое действие на половозрелых крысах-самцах после 30-дневного в/ж введения. Анксиолитический эффект был также подтверждён при применении теста «Экстраполяционное избавление», позволяющего оценить уровень тревожности крыс в условиях острого стресса. Кроме того, данный тест позволяет изучить когнитивные функции в острых стрессогенных условиях. Было отмечено улучшение когнитивных функций после 30-дневного в/ж введения метформина в дозе 70 мг/кг.

Исследование относительного уровня экспрессии гена *Bdnf* позволяет дополнить полученные данные и подтвердить положительное влияние метформина на функции ЦНС в субтерапевтических дозах.

Воздействие метформина на относительный уровень экспрессии нейротрофического фактора *Bdnf* можно рассматривать в качестве одного из ключевых механизмов влияния метформина на геропroteкцию.

Нейротрофический фактор мозга *Bdnf* играет важную роль в нейрогенезе, и нарушение его экспрессии в процессе физиологического старения может оказывать негативное влияние на различные функции ЦНС (когнитивные дисфункции, снижение процессов обучения, а также повышенная тревожность) [21, 139]. Однако существуют данные о различиях в его уровне у крыс-самцов и крыс-самок [1, 139].

Для более детального изучения механизма действия метформина было исследовано его влияние на относительный уровень экспрессии гена нейротрофического фактора *Bdnf* в тканях старых крыс. Интерес вызывает то, что

уровень BDNF у мужчин и женщин различается [1], что может влиять на геропротективное и геротерапевтическое воздействие метформина.

В исследованиях показано, что 30-дневное в/ж введение метформина в дозе 35 мг/кг повышает экспрессию гена *Bdnf* в префронтальной коре у старых крыс-самцов (возраст – 24 мес.). При этом у старых крыс-самок изменений обнаружено не было. Данные этого исследования демонстрируют наличие половых различий в регуляции уровня экспрессии гена *Bdnf* при применении метформина. Вероятно, что повышение экспрессии гена *Bdnf* в префронтальной коре старых крыс-самцов возможно связать с обнаруженной анксиолитической активностью метформина у лабораторных животных. Это может быть связано с усилением нейропластичности, модуляцией моноаминергических систем, а также изменением активности дофаминергической передачи, что влияет на опосредованную ГАМК регуляцию дофамина [9].

Изменение и потеря функций скелетной мускулатуры напрямую взаимосвязано с физиологическим старением и является важной проблемой современной геронтологии [127]. Атрофия мышц, ассоциированная со старением, является одним из распространенных видов мышечной дисфункции, характеризующаяся снижением мышечной массы и мышечной слабостью (саркопенией) [127]. Прогрессирование мышечных нарушений у пожилых пациентов постепенно приводит к атрофии мышц, ограничению подвижности и инвалидизации [127, 130]. Наличие в спектре действия метформина способности повышать тонус скелетных мышц может явиться перспективным направлением. Исследование относительного уровня экспрессии *Bdnf* в мышечных волокнах (*musculus quadriceps*, *musculus soleus*, *gastrocnemius*) под влиянием метформина может иметь определенное значение для понимания одной из возможных точек воздействия метформина на организм. В настоящем исследовании показано увеличение относительного уровня экспрессии нейротрофического фактора *Bdnf* в четырехглавой мышце бедра крыс (*musculus quadriceps*) при 30-дневном в/ж введении метформина в дозе 35 мг/кг старым крысам-самцам. Выраженное увеличение относительного уровня экспрессии нейротрофического фактора *Bdnf* в

четырёхглавой мышце бедра крыс может обуславливать улучшение нейромышечной связи и метаболической функции, что в целом может способствовать усилению мышечной выносливости. Таким образом, вероятно, что метформин может способствовать улучшению мышечной функции крыс [142, 155]. Полученные данные позволяют рассматривать метформин в качестве перспективного терапевтического подхода для коррекции мышечных дисфункций, возникающих в процессе старения. Однако требуется проведение более широкого спектра работ с применением высокоточных методов исследований.

Таким образом, на основании полученных результатов были выявлены половые различия при многократном 30-дневном в/ж применении метформина в малых дозах у старых крыс обоего пола (возраст – 24 мес.), что можно объяснить влиянием половых гормонов (эстрогенов у крыс-самок и тестостерона у крыс-самцов) на эффективность препарата [18, 82]. Важным дополнением является то, что активность *Bdnf* в структурах мозга (гиппокамп и миндалина) также находятся под влиянием половых гормонов [17, 129].

Для дополнения сведений и углубления вопроса о возможном механизме действия метформина не только у старых крыс, но и у половозрелых животных изучено его влияния на относительный уровень экспрессии нейротрофического фактора *Bdnf* и экспрессию субъединиц функционального белка в структурах головного мозга (в гиппокампе и префронтальной коре) половозрелых крыс.

Одновременный анализ соответствующего функционального белка подтвердил достоверность экспрессии субъединиц белка *Bdnf* в структурах головного мозга (гиппокамп, префронтальная кора) крыс при 30-дневном в/ж введении метформина в дозе 35 мг/кг. Полученные данные могут иметь фундаментальное значение в понимании возможных точек воздействия метформина.

Метформин хорошо проникает через ГЭБ и накапливается в различных областях головного мозга, а именно в гиппокампе и префронтальной коре [15, 80]. Так, показано, что 30-дневное в/ж введение метформина повышает относительный уровень экспрессии нейротрофического фактора *Bdnf* в гиппокампе (70 мг/кг и 35

мг/кг) и в префронтальной коре (35 мг/кг) половозрелых крыс-самцов. Таким образом, увеличение относительного уровня экспрессии нейротрофического фактора *Bdnf* в гиппокампе может быть связано с улучшением нейропластичности и когнитивных функций крыс.

Обнаруженный эффект влияния метформина на относительный уровень экспрессии нейротрофического фактора *Bdnf* позволяет предположить, что это может явиться одним из ключевых механизмов действия метформина в качестве геропротекторного средства.

Несомненно, при проведении исследований по изучению новых, ранее не исследованных фармакологических свойств противодиабетического средства встает вопрос, оказывает ли применение метформина в малых дозах влияние на уровень глюкозы экспериментальных животных. Показано, что субтерапевтические дозы (70 мг/кг и 35 мг/кг) метформина при многократном 30-дневном в/ж введении не оказывают своего влияния на уровень глюкозы, что подтверждено путем проведения биохимического анализа сыворотки крови половозрелых крыс обоего пола [9].

Известно, что у пациентов с СД 2-го типа метформин уменьшает уровень ЛПНП [15]. Дислипидемия является фактором развития сердечно-сосудистых заболеваний, кроме того гиперхолестеринемия является риском развития преждевременного старения организма. Соответственно атеросклероз является одной из причин смертности пожилых людей [20]. Поэтому интерес вызывает влияние метформина в малых дозах на уровень ЛПНП половозрелых крыс обоего пола.

Обнаружено, что 30-дневное в/ж введение метформина в обеих исследуемых дозах (70 мг/кг и 35 мг/кг) приводит к уменьшению уровня ЛПНП у крыс-самок в сыворотке крови, при этом у крыс-самцов данного эффекта не выявлено. Возможно, что этот показатель может иметь практическое значение в качестве профилактики дислипидемии.

Немаловажным является выявленный эффект метформина после 30-дневного в/ж введения в дозе 70 мг/кг на мышечную выносливость крыс-самцов в комплексе

«Ротарод» [10]. В будущем это может стать основой для нового вектора исследований свойств метформина с целью коррекции мышечных дисфункций.

В тесте «Водный лабиринт Морриса» дополнительно к исследованию влияния на когнитивные функции, была проведена оценка локомоторной активности крыс обоего пола. Обнаружено влияние метформина на локомоторную активность крыс обоего пола, а именно скорость плавания и пройденный путь. Выявлено, что 30-дневное в/ж введение метформина в дозе 35 мг/кг уменьшало скорость плавания и, соответственно, уменьшало пройденный путь у крыс-самцов. Уменьшение выраженности данных показателей может быть связано с вовлечением анксиолитического компонента метформина. При этом у крыс-самок показано увеличение пройденного пути при применении метформина в дозе 35 мг/кг. Предполагается, что различия в скорости плавания и пройденного пути могут быть обусловлены тем, что крысы-самки обладают меньшими размерами и меньшей силой по сравнению с самцами [19].

Исследования на половозрелых мышах-самцах позволили получить важные экспериментальные данные. Некоторые эффекты, выявленные у крыс-самцов, были подтверждены на беспородных мышах-самцах. При этом некоторые эффекты не совпадали из-за видовой специфичности. На данном этапе объяснений некоторых результатов не найдено. Одно и то же стрессорное воздействие может по-разному влиять на нейроповеденческие характеристики, стрессоустойчивость животных разных линий [11]. Вероятно, необходимо проведение исследований на инбредных мышах линий, например *BALB/c*, *C57BL/6* и *CBA/CaLac*.

В экспериментах был взят диапазон доз для сравнительной оценки, а именно 700 мг/кг, 350 мг/кг, 70 мг/кг и 35 мг/кг.

Для оценки влияния метформина на двигательную-исследовательскую активность половозрелых мышей-самцов был проведен классический тест «Открытое поле» для оценки уровня эмоционально-поведенческой реактивности животного. Полученные результаты исследования при однократном и 14-дневном введении метформина в малых дозах показали, что происходит изменение в поведении животных. Так, наблюдалось повышение двигательной активности при

однократном в/ж введении метформина (350 мг/кг, 70 мг/кг и 35 мг/кг) в тесте «Открытое поле», в то время как при его многократном 14-дневном в/ж введении влияния на двигательную активность мышей обнаружено не было.

Возможно, что однократное введение метформина вызывало стимуляцию психоэмоционального статуса животных. Согласно литературными данным, метформин может ингибировать АХЭ, тем самым вызывая эффекты, вызванные ацетилхолином [15]. Одним из эффектов при введении всех АХЭ средств является стимулирующее влияние на нервно-мышечную передачу, что может способствовать повышению тонуса скелетных мышц [130].

Наряду с повышенной двигательной активностью в тесте «Открытое поле», отмечалось уменьшение исследовательской активности. Что касается исследовательской активности, то применение метформина (700 мг/кг и 35 мг/кг) способствовало уменьшению данного показателя у половозрелых мышей как при однократном, так и при многократном 14-дневном в/ж введении. Возможно, что это можно объяснить наличием анксиолитического действия метформина [22]. Вероятно, это подтверждение вышеуказанного тезиса о снижении тревожности мышей под воздействием метформина.

Наличие анксиолитического эффекта, показанного у крыс подтверждается на мышах. Интересным является выявленный анксиолитический эффект метформина в малых дозах (70 мг/кг и 35 мг/кг) в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» на половозрелых мышах-самцах. При этом в более высоких дозах развитие данного эффекта не наблюдалось. Полученные данные подчеркивают и дополняют сведения о метформине, как потенциальном кандидате для коррекции тревожных расстройств.

Предполагается, что отсутствие статистически значимого эффекта в тесте «Т-образный лабиринт» у половозрелых мышей-самцов обусловлено тем, что при многократном 14-дневном введении метформина мышам происходит ослабление эффекта новизны обстановки в следствии наличия анксиолитического эффекта у метформина, то есть подавление пищевого поведения в условиях новой обстановки.

Проведены пилотные исследования по изучению эффектов и/н введения метформина половозрелым крысам-самцам. Выбор данного пути введения обусловлен тем, что недостатками пероральной лекарственной формы метформина является его невысокая биодоступность (50-60%) [15, 73], а также риск развития нежелательных лекарственных реакций со стороны ЖКТ. Интраназальный путь введения является многообещающим благодаря более таргетному воздействию и сниженной частоте возникновения нежелательных реакций со стороны ЖКТ [26, 103].

Получены результаты влияния 30-дневного и/н введения метформина в субтерапевтической дозе (70 мг/кг) на процессы обучения и памяти, когнитивные функции и уровень тревожности. Проведена оценка влияния метформина на относительный уровень экспрессии нейротрофического фактора *Bdnf* и экспрессию субъединиц функционального белка в структурах мозга (гиппокамп и префронтальная кора) половозрелых крыс-самцов. Показано, что результаты при и/н введении могут быть сопоставимы с его внутрижелудочным введением.

Анализируя поведенческие эффекты метформина при и/н 30-дневном введении, было выявлено улучшение процессов обучения и памяти половозрелых крыс-самцов в тесте «Т-образный лабиринт». В отличие от в/ж введения метформина не выявлен эффект на пространственную память крыс в тесте «Водный лабиринт Морриса», эффект которого может быть связан с влиянием дополнительной стрессовой ситуации [26].

Что касается анксиолитического эффекта при и/н введении метформина, в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» он не выявлен, но он был отмечен в тесте «Экстраполяционное избавление», проводимого в условиях острого стресса.

Снижение этих эффектов обусловлено тем, что одним из недостатков и/н пути введения является быстрое вымывание со слизистой носа, поэтому следует разрабатывать инновационную лекарственную форму с выраженными биоадгезивными свойствами для усиления адгезии на слизистой носа и для более постепенного высвобождения метформина.

Результаты проведенных экспериментальных исследований указывают на целесообразность продолжения изучения роли метформина в качестве потенциального геропротектора с учетом его разнонаправленного механизма действия, безопасности и эффективности.

ВЫВОДЫ

1. 30-дневное внутрижелудочное введение метформина в субтерапевтических дозах, не оказывающих гипогликемического действия, улучшает процессы обучения и памяти, когнитивные функции и снижает уровень тревожности у половозрелых крыс-самцов. Кроме того, 30-дневное внутрижелудочное введение метформина в дозе 35 мг/кг повышает относительный уровень экспрессии гена нейротрофического фактора (*Bdnf*) и субъединиц белка *Bdnf* в гиппокампе и префронтальной коре у половозрелых крыс-самцов.

2. 30-дневное внутрижелудочное введение метформина в дозе 70 мг/кг снижает уровень тревожности, улучшает когнитивные функции у старых крыс-самцов (возраст – 24 мес.). 14-дневное внутрижелудочное введение метформина в обеих исследуемых дозах (70 мг/кг и 35 мг/кг) снижает уровень тревожности у старых мышей-самцов (возраст – 22 мес.). Кроме того 30-дневное внутрижелудочное введение метформина в дозе 35 мг/кг повышает относительный уровень экспрессии гена нейротрофического фактора (*Bdnf*) в префронтальной коре и *musculus quadriceps* у старых крыс-самцов.

3. 30-дневное внутрижелудочное введение метформина в дозе 70 мг/кг усиливает мышечную выносливость у половозрелых крыс-самцов в комплексе «Ротарод», также 30-дневное внутрижелудочное введение метформина в обеих исследуемых дозах (70 мг/кг и 35 мг/кг) уменьшает уровень ЛПНП в сыворотке крови у половозрелых крыс-самок.

4. В эксперименте на половозрелых мышах-самцах 14-дневное внутрижелудочное введение метформина оказывает влияние на их двигательную исследовательскую активность и снижает уровень тревожности.

5. Интраназальное 30-дневное введение метформина (70 мг/кг) улучшает процессы обучения и памяти, когнитивные функции и снижает уровень тревожности у половозрелых крыс-самцов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Метформин в субтерапевтических дозах, не оказывающих гипогликемического действия, является потенциальным геропротектором для коррекции поведенческих и когнитивных изменений в процессе физиологического старения.
2. Необходима разработка интраназальной лекарственной формы метформина для доставки из носа в мозг.
3. Наличие анксиолитического эффекта метформина является основанием для разработки потенциального анксиолитического средства для коррекции тревожных расстройств.
4. При применении метформина следует учитывать выявленные половые различия в фармакологических эффектах.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В дальнейшем планируется проведение фармакологических исследований по изучению влияния метформина на течение нейродегенеративных заболеваний, например, на экспериментальной модели болезни Альцгеймера, с учетом выявленного полового диморфизма, и изучение нейрохимических механизмов, лежащих в основе возможного геропротекторного эффекта метформина.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АМФК	5'-АМФ-активируемая протеинкиназа
АХЭ	ацетилхолинэстераза
в/ж	внутрижелудочное введение
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ГАМК	гамма-аминомасляная кислота
Гип	гиппокамп
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ	желудочно-кишечный тракт
ЗР	«закрытые» рукава
и/н	интраназальное введение
кДа	килодальтон
КНР	Китайская Народная Республика
КПГ	конечные продукты гликирования
ЛПНП	липопротеины низкой плотности
Мет	метформин
МЗ	мозжечок
НПК	научно-производственная компания
ОР	«открытые» рукава
ПК	префронтальная кора
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНК	рибонуклеиновая кислота
РФ	Российская Федерация
СД 2-го типа	сахарный диабет 2-го типа
США	Соединённые Штаты Америки
ФНП	феназепам
ЦНС	центральная нервная система
<i>Bdnf</i>	ген нейротрофического фактора мозга (от англ. brain-derived neurotrophic factor)

<i>Bdnf</i>	белок нейротрофического фактора мозга (от англ. brain-derived neurotrophic factor)
<i>FoxO3a</i>	транскрипционный фактор (от англ. Forkhead box O3)
<i>Gastr.</i>	икроножная мышца (от англ. gastrocnemius)
<i>IFN</i>	интерферон (от англ. interferon)
<i>IL</i>	интерлейкин (от англ. interleukin)
<i>M. quadr.</i>	четырёхглавая мышца бедра (от англ. musculus quadriceps)
<i>M. sol.</i>	камбаловидная мышца (от англ. musculus soleus)
<i>mTOR</i>	механическая мишень рапамицина (от англ. mechanistic Target of Rapamycin)
<i>SIRT</i>	сиртуин (от англ. Sirtuin)
<i>TNFα</i>	фактор некроза опухоли α (от англ. Tumor necrosis factor- α)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аврущенко, М.Ш. Гендерные особенности постреанимационных изменений экспрессии мозгового нейротрофического фактора (BDNF) / М. Ш. Аврущенко, И. В. Острова, А. В. Гречко // *Общая реаниматология*. – 2017. – Т. 13, № 5. – С. 44-57.
2. Батарея тестов для изучения адаптогенного действия биологически активных веществ в доклинических исследованиях / Е. Б. Шустов, С. В. Оковитый, В. Ц. Болотова [и др.] // *Формулы Фармации*. – 2021. – Т. 3, № 2. – С. 10-25.
3. Возрастные изменения внеклеточного матрикса / З. Г. Гуватова, П. В. Борисов, А. А. Алексеев [и др.] // *Биохимия*. – 2022. – Т. 87, № 12. – С. 1897-1915.
4. Вялова, Н. М. Роль BDNF в формировании депрессивных расстройств / Н. М. Вялова, Л. А. Левчук // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – Т. 10, № 4. – С. 771-775.
5. Гипогликемии и риск когнитивных нарушений и деменции у больных пожилого и старческого возраста с сахарным диабетом 2 типа / О. Д. Остроумова, Е. В. Суркова, И. В. Голобородова [и др.] // *Сахарный диабет*. – 2020. – Т. 23, № 1. – С. 72-87.
6. Григорьян, Г. А. Половые различия в поведении и биохимических маркерах у животных в ответ на нейровоспалительный стресс / Г. А. Григорьян // *Успехи физиологических наук*. – 2020. – Т. 51, № 1. – С. 18-32.
7. Зоткин, Е. Г. Воспалительная теория старения, возраст-ассоциированные заболевания и остеоартрит / Е. Г. Зоткин, И. С. Дыдыкина, А. М. Лиля // *Русский Медицинский Журнал*. – 2020. – Т. 7. – С. 33-38.
8. Изучение влияния производного аминокэтанола на когнитивные функции лабораторных животных / И. А. Титович, С. В. Радько, Д. С. Лисицкий [и др.] // *Биомедицина*. – 2017. – № 3. – С. 102-110.
9. Интраназальное введение как способ доставки лекарств в головной мозг (обзор) / Н. Н. Порфирьева, И. И. Семина, Р. И. Мустафин [и др.] // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2021. – Т. 10, № 4. – С. 117-127.

10. Исследование влияния метформина в малых дозах на поведенческие характеристики и биохимические показатели половозрелых крыс / А. З. Хафизова, Д. О. Никитин, Р. Г. Садыкова [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2026. – Т. 15, № 2. – С. 89-97.
11. Коробова, В. Н. Особенности вариабельности ритма сердца самцов и самок крыс Wistar / В. Н. Коробова, И. И. Бобынцев, А. О. Ворвуль // Биомедицина. – 2023. – Т. 19, № 1. – С. 22-33.
12. Левин, О. С. Тревожные расстройства в пожилом возрасте / О. С. Левин, А. Ш. Чимагомедова, А. П. Арефьева // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2019. – Т. 119, № 6. – С. 113-118.
13. Метформин: время расширять показания? / А. Ф. Вербовой, Н. И. Вербовой, Т. В. Ломонова, Ю. А. Долгих // Русский Медицинский Журнал. – 2021. – Т. 29, № 2. – С. 37-41.
14. Общая численность пенсионеров в Российской Федерации // Федеральная служба государственной статистики : сайт. – URL: <https://rosstat.gov.ru>. (дата обращения: 14.02.2026).
15. Перспективы применения противодиабетического средства метформина как способ замедления биологического старения и возраст-ассоциированных заболеваний / А. З. Хафизова, И. И. Семина, Д. О. Никитин [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2025. – Т. 106, № 1. – С. 105-116.
16. Поведенческая фармакология как основной подход в изучении эффективности потенциальных психотропных средств: анализ современных методов / И. И. Семина, А. З. Байчурина, Д. О. Никитин [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12, № 1. – С. 161-181.
17. Половые различия в оборонительном поведении взрослых крыс в ответ на ранний нейровоспалительный стресс / Н. Д. Брошевицкая, И. В. Павлова, М. И. Зайченко [и др.] // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2020. – Т. 70, № 2. – С. 259-276.
18. Половые различия в тревожно-депрессивном и оборонительном поведении крыс Вистар / И. В. Павлова, Н. Д. Брошевицкая, М. В. Онуфриев [и др.]

// Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2020. – Т. 70, № 2. – С. 243-258.

19. Половые различия во влиянии раннего провоспалительного стресса на обучение и память взрослых крыс в водном лабиринте Морриса / М. И. Зайченко, А. В. Шаркова, И. В. Павлова [и др.] // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. – 2022. – Т. 72, № 2. – С. 233-249.

20. Пристром, М. С. Старение физиологическое и преждевременное. Современный взгляд на проблему / М. С. Пристром, С. Л. Пристром, И.И. Семенов // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. – 2017. – Т. 28, № 5-6. – С. 40-64.

21. Роль полиморфных вариантов гена нейротрофического фактора BDNF в процессах активной адаптации к экстремальным условиям и предполагаемой индивидуальной продолжительности жизни / И. М. Спивак, А. Н. Жекалов, Д. Л. Спивак [и др.] // Известия Российской военно-медицинской академии. – 2023. – Т. 42, № 3. – С. 293-301.

22. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А. Н. Миронов, Н. Д. Бунятян, А. Н. Васильев [и др.] – Москва: Гриф и К, 2012. – 944 с.

23. Современные подходы диагностики и коррекции биомаркеров старения / И. Р. Гильмутдинова, И. С. Кудряшова, Е. Ю. Костромина [и др.] // Вестник восстановительной медицины. – 2021. – Т. 20, № 6. – С. 96-102.

24. Соловьева, Э. Ю. Патогенетические подходы к терапии когнитивных нарушений у больных сахарным диабетом / Э. Ю. Соловьева, Э. Д. Джутова, В. С. Князева // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2016. – Т. 116, № 7. – С. 85-93.

25. Стремоухов, А. А. Сахарный диабет 2-го типа в терапевтической практике: не всё так просто / А. А. Стремоухов // Лечащий врач. – 2025. – Т. 28, № 7-8. – С. 34-38.

26. Хафизова, А. З. Изучение возможности применения метформина при интраназальном введении для коррекции поведенческих и когнитивных

дисфункций половозрелых крыс / А. З. Хафизова, И. И. Семина // Фармакокинетика и Фармакодинамика. – 2025. – № 1. – С. 35-42.

27. Численность населения Российской Федерации // Федеральная служба государственной статистики : сайт. – URL: <https://rosstat.gov.ru>. (дата обращения: 14.03.2026).

28. Якимова, Н. Л. Дофамин-зависимое нарушение поведения белых крыс с интоксикацией сулемой в тесте экстраполяционного избавления / Н. Л. Якимова, Л. М. Соседова // Бюллетень Всероссийского научного центра СО РАМН. – 2013. – Т. 89, № 1. – С. 130-133.

29. A preclinical overview of metformin for the treatment of T2DM / T. Zhou, X. Xu, M. Du [et al.] // Biomed Pharmacother. – 2018. – Vol. 106, № 9. – P. 1227-1235.

30. Acetylcholinesterase: A gorge-ous enzyme: Protein Data Bank in Europe. – URL: <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/widgets/QuipStories/AChE/AChE.pdf> (accessed 1.12.2025).

31. Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies / Z. Li, Z. Zhang, Y. Ren [et al.] // Biogerontology. – 2021. – Vol. 22, № 2. – P. 165-187.

32. Aging fits the disease criteria of the International Classification of Diseases / D. Khaltourina, Y. Matveyev, A. Alekseev [et al.] // Mech Ageing Dev. – 2020. – Vol. 189, № 366. – P.111230.

33. Ahmad, R. Oral Health Messiers: Diabetes Mellitus Relevance / R. Ahmad, M. Haque // Diabetes, metabolism syndrome and obesity: targents and therapy. – 2021. – Vol. 2021, № 14. – P. 3001-3015.

34. Albini, M. Astrocytes and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) / M. Albini, A. Krawczun-Rygmaczewska, F. Cesca // Neurosci Res. – 2023. – Vol. 197. – P. 42-51.

35. Anti-Inflammatory Effects of Metformin Irrespective of Diabetes Status / A. R. Cameron, V. L. Morrison, D. Levin [et al.] // Circ Res. – 2016. – Vol. 119, № 5. – P. 652-665.

36. Ashrostaghi, Z. Effect of metformin on the spatial memory in aged rats / Z. Ashrostaghi, F. Ganji, H. Sepehri // National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology. – 2015. – Vol. 5, № 5. – P. 416-420.
37. Association of diabetes with amnesic and nonamnesic mild cognitive impairment. Alzheimer's / R. O. Roberts, D. S. Knopman, Y. E. Geda [et al.] // Dement. – 2014. – Vol. 10, № 1. – P. 18-26.
38. Association of Organic Cation Transporter 1 With Intolerance to Metformin in Type 2 Diabetes: A GoDARTS Study / T. Dujic, K. Zhou, L.A. Donnelly [et al.] // Diabetes. – 2015. – Vol. 64, № 5. – P. 1786-1793.
39. Associations between metabolic syndrome and anxiety, and the mediating role of inflammation: Findings from the UK Biobank / M. Cen, L. Song, X. Fu [et al.] // Brain Behav Immun. – 2024. – № 116. – P. 1-9.
40. Autophagy in healthy aging and disease / Y. Aman, T. Schmauck-Medina, M. Hansen [et al.] // Nat. Aging. – 2021. – Vol. 1, № 8. – P. 634-650.
41. Bailey, C. J. Importance of the Intestine as a Site of Metformin-Stimulated Glucose Utilization / C. J. Bailey, K. J. Mynett, T. Page // Br J of Pharmacol. – 1994. – Vol. 112, № 2. – P. 671-675.
42. Bailey, C. J. Metformin: historical overview / C. J. Bailey // Diabetologia. – 2017. – Vol. 60, № 9. – P. 1566-1576.
43. Bharath, L. P. The intersection of metformin and inflammation / L. P. Bharath, B. S. Nikolajczyk // Am J Physiol Cell Physiol. – 2021. – Vol. 320, № 5. – P. 873-879.
44. Blackburn, E. Human telomere biology: a contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection / E. H. Blackburn, E. S. Epel, J. Lin // Science. – 2015. – Vol. 350, № 6265. – P. 1193-1198.
45. Chaudhary, S. Metformin: Past, Present, and Future / S. Chaudhary, A. Kulkarni // Curr Diab Rep. – 2024. – Vol. 24, № 6, – P. 119-130.
46. Cognitive and functional decline in patients with mild Alzheimer dementia with or without comorbid diabetes / H. Ascher-Svanum, Y.F. Chen, A. Hake [et al.] // Clin Ther. – 2015. – Vol. 37, № 6. – P. 1195-1205.

47. Colucci-D'Amato, L. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer / L. Colucci-D'Amato, L. Speranza, F. Volpicelli // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, № 20. – P. 7777.
48. Comparative effectiveness and safety of medications for type 2 diabetes: an update including new drugs and 2-drug combinations / W. L. Bennett, N. M. Maruthur, S. Singh [et al.] // *Ann Intern Med.* – 2011. – Vol. 154, № 9. – P. 602-613.
49. Critical Review of the Evidence That Metformin Is a Putative Anti-Aging Drug That Enhances Healthspan and Extends Lifespan / I. Mohammed, M.D. Hollenberg, H. Ding [et al.] // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2021. – № 12. – P. 718942.
50. De Magalhães, J.P. The business of anti-aging / J.P. de Magalhães, M. Stevens, D. Thornton // *Trends Biotechnol.* – 2017. – Vol. 35, № 11. – P. 1062-1073.
51. Deacon R. M. J. Appetitive position discrimination in the T-maze / R. M. J. Deacon // *Nat Protoc.* – 2006. – Vol. 1, № 13. – P. 13-15.
52. Deacon, R. M. J. T-maze alternation in the rodent / R. M. J. Deacon, J. N. Rawlins // *Nat Protoc.* – 2006. – Vol. 1, № 1. – P. 7-12.
53. Developing criteria for evaluation of geroprotectors as a key stage toward translation to the clinic/ A. Moskalev, E. Chernyagina, V. Tsvetkov [et al.] // *Aging Cell.* – 2016. – Vol. 15, № 3. – P. 407-415.
54. Disruption of the beclin 1-BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice / Á. Fernández, S. Sebti, Y. Wei [et al.] // *Nature.* – 2018. – Vol. 558, № 7708. – P. 136-140.
55. Effect of dietary supplementation of Padauk (*Pterocarpus soyauxii*) leaf on high fat diet/streptozotocin induced diabetes in rats' brain and platelets / A. S. Saliua, G. Oboh, O. S. Omojokun [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2016. – Vol. 84. – P. 1194-1201.
56. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34) / UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group // *Lancet.* – 1998. – Vol. 352, № 9131. – P. 854-865.

57. Epidemiology of type 2 diabetes—global burden of disease and forecasted trends / M. Khan, M. J. Hashim, J. K. King [et al.] // *J Epidemiol Glob Health*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 107-111. 56
58. Epigenetic mechanisms of longevity and aging / P. Sen, P. P. Shah, R. Nativio [et al.] // *Cell*. – 2016. – Vol. 166, № 4. – P. 822-839. 57
59. Faraji, J. Harnessing BDNF Signaling to Promote Resilience in Aging / J. Faraji, G. A. S. Metz // *Aging Dis*. 2024. – Vol. 16, № 4. – P. 1813-1841. 58
60. Feng, Y.Y. Role of metformin in inflammation / Y. Y. Feng, Z. Wang, H. Pang // *Mol Biol Rep*. – 2023. – Vol. 50, № 1. – P. 789-798. 59
61. Flory, J. H. Metformin Use Reduction in Mild to Moderate Renal Impairment: Possible Inappropriate Curbing of Use Based on Food and Drug Administration Contraindications / J. H. Flory, S. Hennessy // *JAMA Internal Medicine*. – 2015. – Vol. 175, № 3. – P. 458–459. 60
62. Foretz, M. Metformin: update on mechanisms of action and repurposing potential / M. Foretz, B. Guigas, B. Viollet // *Nat Rev Endocrinol*. – 2023. – Vol. 19, № 8. – P. 460-476.
63. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing / J. Campisi, P. Kapahi, G.J. Lithgow [et al.] // *Nature*. – 2019. – Vol. 571, № 7764. – P. 183-192.
64. Fujita, Y. Metformin: New Preparations and Nonglycemic Benefits / Y. Fujita, N. Inagaki // *Curr Diab Rep*. – 2017. – Vol. 17, № 1. – P. 2722-2740.
65. Geroprotectors: a unified concept and screening approaches / A. Moskalev, E. Chernyagina, A. Kudryavtseva [et al.] // *Aging Dis*. – 2017. – Vol. 8, № 3. – P. 354-363.
66. Glossmann, H. H. Metformin and Aging: A Review / H. H. Glossmann, O. M. D. Lutz // *Gerontology*. – 2019. – Vol. 65, № 6. – P. 581-590.
67. Grabowska, W. Sirtuins, a Promising Target in Slowing Down the Ageing Process / W. Grabowska, E. Sikora, A. Bielak-Zmijewska // *Biogerontology*. – 2017. – Vol. 18, № 4. – P. 447-476.

68. Gut microbiota drives age-related oxidative stress and mitochondrial damage in microglia via the metabolite N (6)-carboxymethyllysine / O. Mossad, B. Batut, B. Yilmaz [et al] // *Nat. Neurosci.* – 2022. – Vol. 25, № 3. – P. 295-305.
69. Hallmarks of aging: An expanding universe / C. López-Otín, M. A. Blasco, L. Partridge [et al.] // *Cell.* – 2023. – Vol. 186, № 2. – P. 243-278.
70. He, L. The potential role of Keap1-Nrf2 pathway in the pathogenesis of Alzheimer's disease, type 2 diabetes, and type 2 diabetes-related Alzheimer's disease / L. He, Y. Sun // *Metab Brain Dis.* – 2021. – Vol. 36, № 7. – P. 1469-1479.
71. Huang, W. Lactate Levels With Chronic Metformin Use: A Narrative Review / W. Huang, R. L. Castelino, G. M. Peterson // *Clin Drug Investig.* – 2017. – Vol. 37, № 11. – P. 991-1007.
72. IDF Diabetes Atlas 9th edition 2019 // International Diabetes Federation: website. – URL: <https://idf.org/> (accessed 15.09.2025).
73. Is metformin a perfect drug? Updates in pharmacokinetics and pharmacodynamics / M. Markowicz-Piasecka, M. K. Huttunen, L. Mateusiak [et al.] // *Curr Pharm Des.* – 2017. – Vol. 23, № 17. – P. 2532-2550.
74. Kalantar-Zadeh, K. Should Restrictions Be Relaxed for Metformin Use in Chronic Kidney Disease? No, We Should Never Again Compromise Safety! / K. Kalantar-Zadeh, C. P. Kovesdy // *Diabetes Care.* – 2016. – Vol. 39, № 7. – P. 1281-1286.
75. Kandimalla, R. Is Alzheimer's disease a type 3 diabetes? A critical appraisal / R. Kandimalla, V. Thirumala, P. H. Reddy // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* – 2017. – T. 1863, № 5. – C. 1078-1089.
76. Kristófi, R. Metformin as an anti-inflammatory agent: a short review / R. Kristófi, J. W. Eriksson // *J Endocrinol.* – 2021. – Vol. 251, № 2. – P. R11-R22.
77. Kubben, N. Shared molecular and cellular mechanisms of premature ageing and ageing-associated diseases / N. Kubben, T. Misteli // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2017. – Vol. 18, № 10. – P. 595-609.
78. Kulkarni, A.S. Benefits of Metformin in Attenuating the Hallmarks of Aging / A. S. Kulkarni, S. Gubbi, N. Barzilai // *Cell Metab.* – 2020. – Vol. 32, № 1. – P. 15 - 30.

79. LaMoia, T. E. Cellular and molecular mechanisms of metformin action / T.E. LaMoia, G.I. Shulman // *Endocr Rev.* – 2021. – Vol. 42, № 1. – P. 77-96.
80. Li, N. Actions of Metformin in the Brain: A New Perspective of Metformin Treatments in Related Neurological Disorders / N. Li, T. Zhou, E. Fei // *Int J Mol Sci.* – 2022. – Vol. 23, № 15. – P. 8281.
81. Long-term metformin use and vitamin B12 deficiency in the diabetes prevention program outcomes study / V. R. Aroda, S. L. Edelstein, R. B. Goldberg [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2016. – Vol. 101, № 4. – P. 1754-1761.
82. Lynch, W. J. Biological basis of sex differences in drug abuse: preclinical and clinical studies / W. J. Lynch, M. E. Roth, M. E. Carroll // *Psychopharmacology (Berl).* – 2002. – Vol. 164, № 2. – P. 121-137.
83. Mahmood, K. Metformin: The hidden chronicles of a magic drug / K. Mahmood, M. Naeem, N. A. Rahimnadjad // *Eur J Int Med.* – 2013. – Vol. 24, № 1. – P. 20-26.
84. McCreight, L. J. Metformin and the gastrointestinal tract / L. J. McCreight, C. J. Bailey, E. R. Pearson // *Diabetologia.* – 2016. – Vol. 59, № 3. – P. 426-435.
85. Measuring biological aging in humans: A quest / L. Ferrucci, M. Gonzalez-Freire, E. Fabbri [et al.] // *Aging Cell.* – 2020. – Vol. 19, № 2. – P. e13080.
86. Metabolic syndrome and the risk of mild cognitive impairment and progression to dementia follow-up of the Singapore longitudinal ageing study cohort / T. P. Ng, L. Feng, M. S. Nyunt [et al.] // *JAMA Neurol.* – 2016. – Vol. 73, № 4. – P. 456-463.
87. Metformin - a Future Therapy for Neurodegenerative Diseases / M. Markowicz-Piasecka, J. Sikora, A. Szydłowska [et al.] // *Pharm Res.* – 2017. – Vol. 34, № 12. – P. 2614-2627.
88. Metformin: A Promising Antidiabetic Medication for Cancer Treatment / W. Mu, Y. Jiang, G. Liang [et al.] // *Curr Drug Targets.* – 2023. – Vol. 24, № 1. – P. 41-54.
89. Metformin: A Review of Potential Mechanism and Therapeutic Utility Beyond Diabetes / S. Dutta, R. B. Shah, S. Singhal [et al.] // *Drug Des Devel Ther.* – 2023. – № 17. – P. 1907-1932.

90. Metformin: is it a drug for all reasons and diseases? / C.R. Triggle, I. Mohammed, K. Bshesh // *Metabolism*. – 2022. – Vol. 133. – P. 155223.
91. Metformin Activates a Duodenal Ampk-Dependent Pathway to Lower Hepatic Glucose Production in Rats / F. A. Duca, C. D. Côté, B. A. Rasmussen [et al.] // *Nat Med*. – 2016 – Vol. 21, № 5. – P. 506-511.
92. Metformin activation of AMPK suppresses AGE-induced inflammatory response in hNSCs / M. M. Chung, C. J. Nicol, Y. C. Cheng [et al.] // *Exp Cell Res*. – 2017. – Vol. 352, № 1. – P. 75-83.
93. Metformin and Insulin Resistance: A Review of the Underlying Mechanisms behind Changes in GLUT4-Mediated Glucose Transport / R. Herman, N. A. Kravos, M. Jensterle [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2022. – Vol. 23, № 3. – P. 1264.
94. Metformin and risk of mortality in patients hospitalised with COVID-19: a retrospective cohort analysis / C. T. Bramante, N. E. Ingraham, T. A. Murray [et al.] // *Lancet Healthy Longev*. – 2021. – Vol. 2, № 1. – P. e34-e41.
95. Metformin as a Tool to Target Aging / N. Barzilai, J. P. Crandall, S. B. Kritchevsky [et al.] // *Cell Metab*. – 2016. – Vol. 23, № 6. – P. 1060-1065.
96. Metformin improves learning and memory in the SAMP8 mouse model of Alzheimer's disease / S. A. Farr, E. Roesler, M. L. Niehoff [et al.] // *J Alzheimers Dis*. – 2019. – Vol. 68, № 4. – P. 1699-1710.
97. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells / Y. Hattori, K. Suzuki, S. Hattori [et al.] // *Hypertension*. – 2006. – Vol. 47, № 6. – P. 1183-1188.
98. Metformin inhibits nuclear factor- κ B activation and inflammatory cytokines expression induced by high glucose via adenosine monophosphate-activated protein kinase activation in rat glomerular mesangial cells in vitro / J. Gu, S. Ye, S. Wang [et al.] // *Chin Med J (Engl)*. – 2014. – Vol. 127, № 9. – P. 1755-1760.
99. Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells / K. Isoda, J. L. Young, A. Zirlik [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2006. – Vol. 26, № 3. – P. 611-617.

100. Metformin Is a Direct SIRT1-Activating Compound: Computational Modeling and Experimental Validation / E. Cuyàs, S. Verdura, L. Llorach-Parés [et al.] // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2018. – № 9. – P. 657.

101. Metformin Modulates Hyperglycaemia-Induced Endothelial Senescence and Apoptosis Through SIRT1 / G. Arunachalam, S. M. Samuel, I. Marei [et al.] // *Br J Pharmacol*. – 2014. – Vol. 171, № 2. – P. 523-535.

102. Metformin preconditioning provides neuroprotection through enhancement of autophagy and suppression of inflammation and apoptosis after spinal cord injury / C. Wang, C. Liu, K. Gao [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2016. – Vol. 477, № 4. – P. 534-540.

103. Metformin produces anxiolytic-like effects in rats by facilitating GABAA receptor trafficking to membrane / J. Fan, D. Li, H.S. Chen [et al.] // *Br J Pharmacol*. 2019. – Vol. 176, № 2. – P. 297-316.

104. Metformin treatment prevents amyloid plaque deposition and memory impairment in APP/PS1 mice / Z. Ou, X. Kong, X. Sun [et al.] // *Brain Behav Immun*. – 2018. – Vol. 69. – P. 351–363.

105. Metformin, a biological and synthetic overview / E. D. Hernández-Velázquez, C. Alba-Betancourt, Á. J. Alonso-Castro [et al.] // *Bioorg Med Chem Lett*. – 2023. – Vol. 86, № 5. – P. 129241.

106. Metformin, the Aspirin of the 21st Century: Its Role in Gestational Diabetes Mellitus, Prevention of Preeclampsia and Cancer, and the Promotion of Longevity / R. Romero, O. Erez, M. Hüttemann [et al.] // *Am J Obstet Gynecol*. – 2017. – Vol. 217, № 3. – P. 282 - 302.

107. Metrnl regulates cognitive dysfunction and hippocampal BDNF levels in D-galactose-induced aging mice / C. Hong, Z. Wang, S. L. Zheng [et al.] // *Acta Pharmacol Sin*. – 2023. – Vol. 44, № 4. – P. 741-751.

108. Mitochondrial (Dys)function and Insulin Resistance: From Pathophysiological Mechanisms to the Impact of Diet / D. Sergi, N. Naumovski, L. K. Heilbronn [et al.] // *Front Physiol*. – 2019. – № 10. – P. 532.

109. Mittal, K. Shared links between type 2 diabetes mellitus and alzheimer's disease: A review / K. Mittal, D. P. Katare // *Diabetes Metab Syndr.* – 2016. – Vol. 10, № 2. – P. S144-149.
110. Morigi, M. Sirtuins in Renal Health and Disease / M. Morigi, L. Perico, A. Benigni // *J Am Soc Nephrol.* – 2018. – Vol. 29, № 7. – P. 1799-1809.
111. Moskalev, A. A. Potential Geroprotectors - From Bench to Clinic / A. A. Moskalev // *Biochemistry (Moscow).* – 2023. – Vol. 88, № 11. – P. 1732-1738.
112. Moskalev, A. Is anti-ageing drug discovery becoming a reality? / A. Moskalev // *Expert Opin. Drug Discov.* – 2020. – Vol. 15, № 2. – P. 135-138.
113. Mouse behavior in the open-field test after meloxicam administration / A. T. Antiorio, J. Alemán-Laporte, D. A. Zanatto [et al.] // *J Am Assoc Lab Anim Sci.* – 2022. – Vol. 61, № 3. – P. 270-274.
114. Natural Autophagy Activators to Fight Age-Related Diseases / V.M. Mundo Rivera, J.R. Tlacuahuac Juarez, N.M. Murillo Melo [et al.] // *Cells.* – 2024. – № 13, № 19. – P. 1611.
115. Nojima, I. Metformin and Its Immune-Mediated Effects in Various Diseases / I. Nojima, J. Wada // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24, № 1. – P. 755.
116. Oxidative stress: The nexus of obesity and cognitive dysfunction in diabetes / H. Li, J. Ren, Y. Li [et al.] // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2023. – № 14. – P. 1134025.
117. Pilly, P. K. How do spatial learning and memory occur in the brain? Coordinated learning of entorhinal grid cells and hippocampal place cells / P. K. Pilly, S. Grossberg // *J Cogn Neurosci.* – 2012. – Vol. 24, № 5. – P. 1031–1054.
118. Portero-Otin, M. Dietary Advanced Glycation End Products: Their Role in the Insulin Resistance of Aging / M. Portero-Otin, M. P. de la Maza, J. Urizarri // *Cells.* – 2023. – Vol. 12, № 13. – P. 1684.
119. Preserving renal function in adults with hypertension and diabetes: a consensus approach. National Kidney Foundation Hypertension and Diabetes Executive Committees Working Group / G. L. Bakris, M. Williams, L. Dworkin [et al.] // *Am J Kidney Dis.* – 2000. – Vol. 36, № 3. – P. 646-661.

120. Prieto, L. I. Cellular senescence and the immune system in cancer / L. I. Prieto, D. J. Baker // *Gerontology*. – 2019. – Vol. 65, № 5. – P. 505-512.
121. Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin-induced diabetes / P. Bhutada, Y. Mundhada, K. Bansod [et al.] // *Beh Brain res*. – 2011. – Vol. 220, № 1. – P. 30-41.
122. Pugazhenth, S. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and alzheimer's disease / S. Pugazhenth, L. Qin, P. H. Reddy // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. – 2017. – Vol. 1863, № 5. – P. 1037-1045.
123. Rena, G. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? / G. Rena, E. R. Pearson, K. Sakamoto // *Diabetologia*. – 2013. – Vol. 56, № 9. – P. 1898-1898.
124. Rizos, C. V. Metformin and cancer / C. V. Rizos, M. S. Elisaf // *Europe Journal of Pharmacology*. – 2013. – Vol. 705. – P. 96-108.
125. Rosell-Díaz, M. Metformin, Cognitive Function, and Changes in the Gut Microbiome / M. Rosell-Díaz, J. M. Fernández-Real // *Endocr Rev*. – 2024. – Vol. 45, № 2. – P. 210-226.
126. Sanchez-Rangel, E. Metformin: clinical use in type 2 diabetes / E. Sanchez-Rangel, S. E. Inzucchi // *Diabetologia*. – 2017. – Vol. 60, № 9. – P. 1586-1593.
127. Sarcopenia: Aging-Related Loss of Muscle Mass and Function / L. Larsson, H. Degens, M. Li [et al.] // *Physiological reviews*. – 2019. – Vol. 99, № 1. – P. 427-451.
128. Sayedali, E. Association between metformin and vitamin B12 deficiency in patients with T2DM: a systematic review and meta-analysis / E. Sayedali, A. E. Yalin, S. Yalin // *Diabetes Metab*. – 2023. – Vol. 14, № 5. – P. 585-593.
129. Scharfman, H. E. Differential regulation of BDNF, synaptic plasticity and sprouting in the hippocampal mossy fiber pathway of male and female rats / H. E. Scharfman, N. J. MacLusky // *Neuropharmacology*. – 2014. – № 76. – P. 696-708.
130. Shang, R. Mechanisms and effects of metformin on skeletal muscle disorders / R. Shang, J. Miao // *Front Neurol*. – 2023. – № 14. – P. 1275266.

131. Soukas, A.A. Metformin as anti-aging therapy: is it for everyone? / A.A. Soukas, H. Hao, L. Wu // *Trends Endocrinol Metab.* – 2019. – Vol. 30, № 10. – P. 745-755.
132. Sturman, O. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test / O. Sturman, P.L. Germain, J. Bohacek // *Stress.* – 2018. – Vol. 21, № 5. – P. 443-452.
133. Targeting aging mechanisms: pharmacological perspectives / A. Moskalev, Z. Guvatova, I. A. Lopes [et al.] // *Trends Endocrinol Metab.* – 2022. – Vol. 33, № 4. – P. 266-280.
134. Telomere biology and age-related diseases / M. Herrmann, I. Pusceddu, W. März [et al.] // *Clin Chem Lab Med.* – 2018. – Vol. 56. – P. 1210-1222.
135. Telomere, and its role in the aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction / Y. Zhu, X. Liu, X. Ding [et al.] // *Biogerontology.* – 2019. – Vol. 20, № 1. – P. 1-16.
136. The Anti-Aging Mechanism of Metformin: From Molecular Insights to Clinical Applications / T. Zhang, L. Zhou, M. J. Makarczyk [et al.] // *Molecules.* – 2025. – Vol. 30, № 4. – P. 816.
137. The Association of Late-Life Diabetes Status and Hyperglycemia With Incident Mild Cognitive Impairment and Dementia: The ARIC Study / A. M. Rawlings, A. R. Sharrett, M. S. Albert [et al.] // *Diabetes Care.* – 2019. – Vol. 42, № 7. – P. 1248-1254.
138. The direct targets of metformin in diabetes and beyond / L. Yao, L. Wang, R. Zhang [et al.] // *Trends Endocrinol Metab.* – 2025. – Vol. 36, № 4. – P. 364-372.
139. The effect of metformin on behavioral characteristics and Bdnf gene expression of old rats with sex differences / A. Z. Hafizova, E. V. Valeeva, D. O. Nikitin [et al.] // *Res Results in Pharmacol.* – 2025. – Vol. 11, № 4. – P. 155-161.
140. The effects of metformin on autophagy / G. Lu, Z. Wu, J. Shang [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2021. – Vol. 137, № 4. – P. 111286.

141. The impact of diabetes on cognitive impairment and its progression to dementia / A. Dove, Y. Shang, W. Xu [et al.] // *Alzheimers Dement.* – 2021. – Vol. 17, № 11. – P. 1769-1778.
142. The Molecular Effects of BDNF Synthesis on Skeletal Muscle: A Mini-Review / I. Rentería, P. C. García-Suárez, A. C. Fry [et al.] // *Front Physiol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 934714.
143. The Primary Glucose-Lowering Effect of Metformin Resides in the Gut, Not the Circulation: Results From Short-Term Pharmacokinetic and 12-Week Dose-Ranging Studies / J. B. Buse, R. A. DeFronzo, J. Rosenstock [et al.] // *Diabetes Care.* – 2016. – Vol. 39, № 2. – P. 198-205.
144. The Role of Advanced Glycation End Products in Aging and Metabolic Diseases: Bridging Association and Causality / J. Chaudhuri, Y. Bains, S. Guha [et al.] // *Cell Metabolism.* – 2018. – Vol. 28, № 3. – P. 337-352.
145. The Role of Sirtuins in Cellular Homeostasis / W. Kupis, J. Pałyga, E. Tomal [et al.] // *J Physiol Biochem.* Vol. 72, № 3. – P. 371-380.
146. Theories of aging and the prevalence of Alzheimer's disease / K. Trevisan, R. Cristina-Pereira, D. Silva-Amaral [et al.] // *Biomed Res Int.* – 2019. – Vol. 2019. P. 9171424.
147. Translation elongation rate varies among organs and decreases with age / M. V. Gerashchenko, Z. Peterfi, S. H. Yim [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2021. – Vol. 49, № 2. – P. e9.
148. Tulipano, G. Integrated or Independent Actions of Metformin in Target Tissues Underlying Its Current Use and New Possible Applications in the Endocrine and Metabolic Disorder Area / G. Tulipano // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, № 23. – P. 13068.
149. Type 2 diabetes and cognitive dysfunction—towards effective management of both comorbidities / V. Srikanth, A. J. Sinclair, F. Hill-Briggs [et al.] // *Lancet Diabetes. Endocrinol.* – 2020. – Vol. 8, № 6 – P. 535-545.

150. Vallianou, N. G. Metformin and Gut Microbiota: Their Interactions and Their Impact on Diabetes / N. G. Vallianou, T. Stratigou, S. Tsagarakis // *Hormones (Athens)*. – 2019. – Vol. 18. – P. 141-144.
151. Vascular Senescence in Cardiovascular and Metabolic Diseases / G. Katsuumi, I. Shimizu, Y. Yoshida [et al.] // *Front Cardiovasc Med*. – 2018. – Vol. 5, № 18. – P. 18.
152. World Population Prospects 2024: Summary of Results / United Nations: website. – URL: <https://www.un.org/development/desa/pd/content/world-population-prospects-2024-summary-results-0?ysclid=mnyhmxxfjz701531675> (accessed: 11.03.2026).
153. Yang, Y. Metformin decelerates aging clock in male monkeys / Y. Yang, X. Lu, N. Liu // *Cell*. – 2024. – Vol. 187, № 22. – P. 6358-6378.e29.
154. Yerevanian, A. Metformin: mechanisms in human obesity and weight loss / A. Yerevanian, A. A. Soukas // *Curr Obes Rep*. – 2019. – Vol. 8, № 2. – P. 156-164.
155. Zhang, Z. BDNF Contributes to the Skeletal Muscle Anti-atrophic Effect of Exercise Training through AMPK-Pgc1 α Signaling in Heart Failure Mice / Z. Zhang, B. Wang, A. Fei // *Arch Med Sci*. – 2019. – Vol. 15, № 1. – P. 214-222.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Таблица 1– Дизайн исследования	28
Рисунок 1– Структурная формула метформина гидрохлорида	29
Таблица 2 – Диапазон доз и путей введения метформина лабораторным животным	29
Таблица 3 – Лабораторные животные, применяемые в работе.....	30
Рисунок 2 – Влияние метформина на двигательную активность половозрелых мышей-самцов в тесте «Открытое поле» при однократном (А) и 14-дневном (Б) внутрижелудочном введении.	40
Рисунок 3 – Влияние метформина на исследовательскую активность половозрелых мышей-самцов в тесте «Открытое поле» при однократном (А) и 14-дневном (Б) внутрижелудочном введении.	41
Рисунок 4 – Влияние метформина на тревожность половозрелых мышей-самцов в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в «открытых» рукавах при однократном (А) и 14-дневном (Б) внутрижелудочном введении.	42
Рисунок 5 – Влияние метформина на тревожность половозрелых мышей-самцов в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в «закрытых» рукавах при однократном (А) и 14-дневном (Б) внутрижелудочном введении.	43
Таблица 4 – Влияние метформина на тревожность половозрелых мышей-самцов в тесте «Темно-светлая камера» при однократном и 14-дневном внутрижелудочном введении	44
Таблица 5 – Влияние метформина на процессы обучения и памяти половозрелых мышей-самцов в тесте «Т-образный лабиринт» при 14-дневном внутрижелудочном введении	45
Таблица 6 – Влияние метформина на двигательную активность половозрелых мышей-самцов в тесте «Открытое поле» при однократном и 14-дневном внутрижелудочном введении в высокой дозе.....	46

Таблица 7 – Влияние метформина на исследовательскую активность половозрелых мышей-самцов в тесте «Открытое поле» при однократном и 14-дневном внутрижелудочном введении в высокой дозе.....	46
Таблица 8 – Влияние метформина на тревожность половозрелых мышей-самцов в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в «открытых» рукавах при 14-дневном внутрижелудочном введении в высокой дозе	47
Таблица 9 – Влияние метформина на тревожность половозрелых мышей-самцов в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в «закрытых» рукавах при 14-дневном внутрижелудочном введении в высокой дозе	47
Рисунок 6 – Влияние метформина на процессы обучения и памяти половозрелых крыс-самцов в тесте «Т-образный лабиринт» при 30-дневном внутрижелудочном введении.	49
Таблица 10 – Влияние метформина на пространственную память половозрелых крыс-самцов в тесте «Водный лабиринт Морриса» при 30-дневном внутрижелудочном введении	50
Рисунок 7 – Влияние метформина на относительный уровень экспрессии гена <i>Bdnf</i> половозрелых крыс-самцов после 30-дневного внутрижелудочного введения.....	51
Рисунок 8 – Влияние метформина на уровень тревожности половозрелых крыс-самцов в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» при 30-дневном внутрижелудочном введении.	52
Рисунок 9 – Влияние метформина на тревожность половозрелых крыс-самцов в тесте «Экстраполяционное избавление» при 30-дневном внутрижелудочном введении.	53
Рисунок 10 – Влияние метформина на когнитивные функции половозрелых крыс-самцов в тесте «Экстраполяционное избавление» при 30-дневном внутрижелудочном введении.	54
Рисунок 11 – Влияние метформина на мышечную выносливость половозрелых крыс обоего пола в комплексе «Ротарод» при 30-дневном внутрижелудочном введении.	56

Рисунок 12 – Влияние метформина на двигательную-координационную функцию половозрелых крыс обоего пола в тесте «Водный лабиринт Морриса» при 30-дневном внутрижелудочном введении.....	57
Рисунок 13 – Влияние метформина на локомоторную активность половозрелых крыс обоего пола в тесте «Водный лабиринт Морриса» при 30-дневном внутрижелудочном введении.	58
Рисунок 14 – Влияние метформина на процессы обучения и памяти половозрелых крыс-самцов в тесте «Т-образный лабиринт» при 30-дневном интраназальном введении.	60
Таблица 11 – Влияние метформина на пространственную память половозрелых крыс-самцов в тесте «Водный лабиринт Морриса» при 30-дневном интраназальном введении	61
Рисунок 15 – Влияние метформина на относительный уровень экспрессии гена <i>Bdnf</i> половозрелых крыс-самцов после 30-дневного интраназального введения.....	61
Таблица 12 – Влияние метформина на уровень тревожности половозрелых крыс-самцов в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в «открытых» рукавах при 30-дневном интраназальном введении.....	63
Таблица 13 – Влияние метформина на уровень тревожности половозрелых крыс-самцов в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» в «закрытых» рукавах при 30-дневном интраназальном введении.....	63
Рисунок 16 – Влияние метформина на тревожность половозрелых крыс-самцов в тесте «Экстраполяционное избавление» при 30-дневном интраназальном введении.	64
Рисунок 17 – Влияние метформина на когнитивные функции половозрелых крыс-самцов в тесте «Экстраполяционное избавление» при 30-дневном интраназальном введении.	65
Рисунок 18 – Влияние метформина на тревожность старых мышей-самцов (возраст – 22 мес.) в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» при 14-дневном внутрижелудочном введении.	67

Таблица 14 – Влияние метформина на процессы обучения и памяти старых мышей-самцов (возраст – 22 мес.) тесте «Т-образный лабиринт» при 14-дневном внутрижелудочном введении	68
Рисунок 19 – Влияние метформина на тревожность старых крыс обоего пола (возраст – 24 мес.) в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» при 30-дневном внутрижелудочном введении.....	69
Рисунок 20 – Влияние метформина на пространственную память старых крыс обоего пола (возраст – 24 мес.) в тесте «Водный лабиринт Морриса» при 30-дневном внутрижелудочном введении.....	71
Рисунок 21 – Влияние метформина на относительный уровень экспрессии гена <i>Bdnf</i> в структурах мозга старых крыс-обоего пола (возраст – 24 мес.).	72
Рисунок 22 – Влияние метформина на относительный уровень экспрессии гена <i>Bdnf</i> в мышечных волокнах старых крыс обоего пола.	74

ПРИЛОЖЕНИЯ

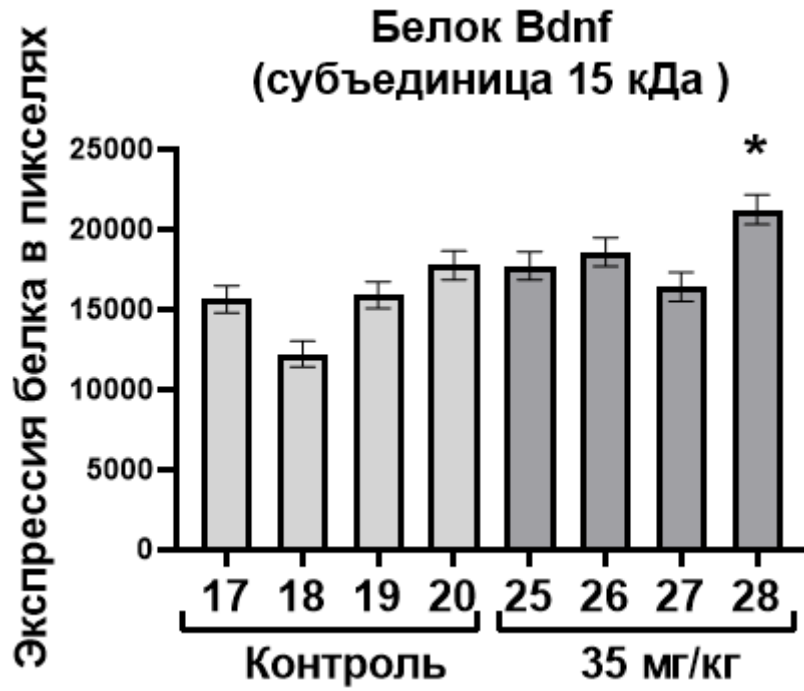
Приложение 1 – Влияние 30-дневного введения метформина на относительный уровень экспрессии нейротрофического фактора *Bdnf* в структурах головного мозга половозрелых крыс-самцов

Путь введения	Исследуемая группа	Структуры головного мозга	
		Гиппокамп	Префронтальная кора
В/ж	Метформин 70 мг/кг	1,34 (1,21-1,49)* $p=0,029$	0,61 (0,43-0,88)
	Метформин 35 мг/кг	1,28 (1,17-1,40)* $p=0,040$	1,57 (1,47-1,67)* $p=0,034$
	Контроль	1,00 (0,93-1,08)	1,00 (0,83-1,20)
И/н	Метформин 70 мг/кг	1,24 (1,14-1,36)# $p=0,083$	1,09 (0,80-1,47)
	Контроль	1,00 (0,92-1,09)	1,00 (0,84-1,18)

Примечание – * $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

$p < 0,1$ – тенденция к достоверности с группой контроля

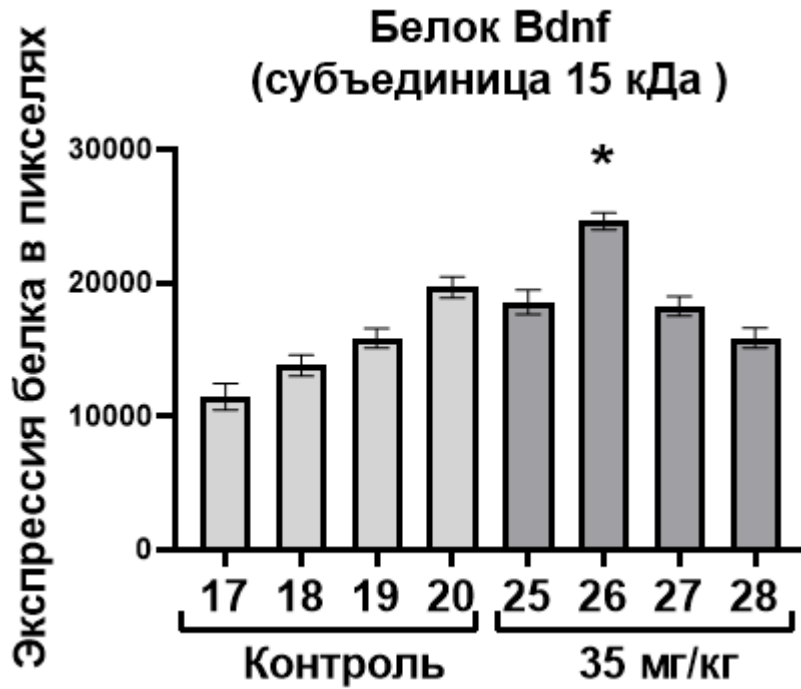
Приложение 2 – Влияние 30-дневного введения метформина в дозе 35 мг/кг на экспрессию субъединиц белка Vdnf в гиппокампе половозрелых крыс-самцов



Примечание – кДа – килодальтон

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

Приложение 3 – Влияние 30-дневного введения метформина в дозе 35 мг/кг на экспрессию субъединиц белка Vdnf в префронтальной коре половозрелых крыс-самцов



Примечание – кДа – килодальтон

* $p < 0,05$ – статистически значимые различия с группой контроля

Приложение 4 – Влияние 30-дневного введения метформина на биохимические показатели сыворотки крови половозрелых крыс обоего пола

Исследуемая группа	Биохимические показатели сыворотки крови крыс-самцов		
Крысы-самцы	Глюкоза, ммоль/л	Холестерин, ммоль/л	ЛПНП, ммоль/л
Метформин 70 мг/кг	6,85±0,26	2,1±0,16	0,39±0,05
Метформин 35 мг/кг	7,98±0,35	2,28±0,07	0,44±0,02
Контроль	7,25±0,27	2,32±0,15	0,5±0,03
Исследуемая группа	Биохимические показатели сыворотки крови крыс-самок		
Крысы-самки	Глюкоза ммоль/л	Холестерин ммоль/л	ЛПНП ммоль/л
Метформин 70 мг/кг	7,37±0,26	2,03±0,15	0,26±0,01* <i>p</i> =0,0169
Метформин 35 мг/кг	7,59±0,11	1,72±0,16	0,25±0,02* <i>p</i> =0,0443
Контроль	7,5±0,12	1,9±0,06	0,32±0,02

Примечание – **p* < 0,05 – статистически значимые различия с группой контроля

Приложение 5 – Влияние 30-дневного введения метформина на относительный уровень экспрессии нейротрофического фактора *Bdnf* в тканях старых крыс обоего пола (возраст – 24 мес.)

Старые крысы-самцы (возраст – 24 мес.)			
Ткань	Контроль	Метформин 70 мг/кг	Метформин 35 мг/кг
ПК	1 (0,65-1,53)	2,03 (1,82-2,27)	3,27 (2,57-4,16)* <i>p</i> =0,047
МЗ	1 (0,73-1,38)	0,69 (0,63-0,76)	1,22 (0,84-1,77)
Гип	1 (0,59-1,70)	0,24 (0,17-0,34)	0,54 (0,40-0,74)
<i>Gastr.</i>	1 (0,62-1,61)	1,44 (0,93-2,23)	1,68 (1,43-1,98)
<i>M. quadr.</i>	1 (0,56-1,78)	4,23 (0,84-21,33)	18,23 (12,97-25,64)* <i>p</i> =0,006
<i>M. sol.</i>	1 (0,70-1,42)	0,71 (0,65-0,77)	1,22 (0,83-1,79)
Старые крысы-самки (возраст – 24 мес.)			
Ткань	Контроль	Метформин 70 мг/кг	Метформин 35 мг/кг
ПК	1 (0,28-3,55)	1,00 (0,75-1,82)	4,16 (2,47-7,00)
МЗ	1 (0,54-1,85)	0,92 (0,80-1,05)	1,95 (1,51-2,52)
Гип	1 (0,75-1,34)	2,00 (1,17-3,43)	2,21 (1,21-4,03)
<i>Gastr.</i>	1 (0,70-1,42)	0,29 (0,16-0,51)	1,13 (0,52-2,49)
<i>M. quadr.</i>	1 (0,81-1,24)	0,47 (0,21-1,04)	0,61 (0,53-0,70)
<i>M. sol.</i>	1 (0,58-1,72)	1,00 (0,78-1,27)	1,10 (0,94-1,28)

Примечание – ПК – префронтальная кора, МЗ – мозжечок, Гип – гиппокамп, *Gastr.* – *gastrocnemius*, *M. quadr.* – *musculus quadriceps*, *M. sol.* – *musculus soleus*

**p* < 0,05 – статистически значимые различия с группой контроля