

На правах рукописи

Куркин Денис Владимирович

**ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И НЕКОТОРЫЕ
ПЛЕЙОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ АГОНИСТОВ GPR119 РЕЦЕПТОРА И ИХ
КОМБИНАЦИЙ С ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Волгоград, 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант: член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор **Тюренков Иван Николаевич**

Официальные оппоненты:

Воронина Татьяна Александровна, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией психофармакологии ФГБНУ НИИ фармакологии имени В.В. Закусова

Покровский Михаил Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Каленикова Елена Игоревна, доктор фармацевтических наук, доцент, заведующая кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела Факультета фундаментальной медицины, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущее учреждение:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится "___" _____ 2018 г. в _____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru) ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан "___" _____ 2018 г.

Ученый секретарь Диссертационного Совета, доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Распространенность сахарного диабета в настоящее время принимает масштабы эпидемии. В России по состоянию 2016 г. зарегистрировано свыше 4,2 млн человек с диагнозом сахарный диабет 2 типа (СД2), что на 5% больше, чем в 2015 г. [Романцова Т. И., 2011; Недогода С. В., 2015; Дедов И. И., 2016; Шестакова М. В., 2016]. Результаты первого национального эпидемиологического кросс-секционного исследования распространенности СД2 показывают, что фактическое число пациентов с этим заболеванием значительно превышает цифры, указанные в Государственном реестре сахарного диабета [Дедов И. И., 2016].

Фармакотерапия является основным способом установления контроля над СД2. Российские национальные рекомендации по лечению СД2 [Дедов И. И., 2017, 2015] включают 9 фармакологических групп, лекарственные препараты которых стимулируют секрецию инсулина (препараты сульфонилмочевины, меглитиниды), снижают инсулинорезистентность и продукцию глюкозы печенью (бигуаниды, тиазолидиндионы), замедляют всасывание углеводов в кишечнике (ингибиторы α -глюкозидаз) или ее реабсорбцию в почках (ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2 типа), являются синтетическими аналогами ГПП-1 (агонисты рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 (аГПП-1)) или препаратами, замедляющими его физиологическую деградацию (идППП-4), а также человеческий инсулин. Несмотря на кажущееся разнообразие средств для фармакотерапии СД, ее эффективность остается низкой в силу различных этиологических, патогенетических и социальных причин, исходящих из индивидуальных особенностей течения заболевания у пациента и его образа жизни [Дедов И. И., 2015; Недогода С. В., 2015]. Поэтому поиск новых средств лечения СД2 и его осложнений продолжает оставаться актуальной задачей современной фармакологии.

В последнее десятилетие внимание специалистов в области фармакологии гипогликемических лекарственных средств обращено к попытке экзогенного влияния на систему инкретинов [Дедов И. И., 2012; Аметов А. С., 2013; Спасов А. А., 2013, 2015; Сухарева О. Ю., 2012; Шестакова М. В., 2012; Campbell J. E., 2013; DeFronzo R. A., 2015; Li Y., 2016]. Функционирование этой системы при СД2 и ожирении нарушено, а в условиях здорового организма представляет собой важнейший механизм регуляции углеводного обмена, обеспечивающий до 50-70% постпрандиальной секреции инсулина. Восстановление нормального биосинтеза и метаболизма инкретинов, реагирования инкретиновой системы на поступление пищи является перспективным подходом в попытке управления метаболическими заболеваниями [Дедов И. И., 2013; Спасов А. А., 2015].

Степень научной разработанности проблемы

Система инкретинов в качестве мишени фармакологического управления метаболическими нарушениями стала рассматриваться с выяснения их роли в поддержании гомеостаза углеводов, патофизиологии СД2 и ожирения [Мкртумян А.М., 2008]. К настоящему времени успешно реализовано два подхода поддержания концентрации активной формы основных энтеральных гормонов, секретируемых в кровь L- и K-клетками слизистой оболочки кишечника. Первый – ингибирование фермента, вызывающего их физиологическую деградацию – дипептидилпептидазы-4 (идППП-4). В последние десятилетия широкое распространение на мировом фармацевтическом рынке получили 5 представителей ингибиторов этого фермента (ситаглиптин, линаглиптин, алоглиптин, вилдаглиптин, саксаглиптин) и еще 12 проходят различные стадии клинических исследований или одобрены к применению только в некоторых странах (госоглиптин, гемиглиптин, омариглиптин, трелаглиптин, анаглиптин, денаглиптин, мелоглиптин, тенелиглиптин, ретаглиптин, эвоглиптин, дутаглиптин, кармеглиптин), но не получили одобрения авторитетных профильных агентств и ассоциаций (FDA, EMEA, ADA, EASD). Обозначенные выше идППП-4 различаются селективностью к ферменту, некоторыми особенностями метаболического действия и фармакокинетики, эффективными дозами и режимом приема. Второй подход заключается в экзогенном введении синтетических и устойчивых к действию ДПП-4 агонистов

глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) (эксенатид, лираглутид, ликсисентид, албиглутид, дулаглутид и другие) [Галстян, К. О., 2016; Шестакова М. В., 2012; Tomlinson B., 2016].

Ведущие фармацевтические компании пытаются реализовать возможность повышения секреции инкретинов энтероэндокринными клетками кишечника путем стимулирования особой группы локализованных на них рецепторов. В нормальных условиях их физиологическими активаторами являются свободные жирные кислоты, поступающие с пищей или образующиеся в результате ферментации пищевых волокон под действием микробиоты кишечника [Ge H., 2008; Watterson K. R., 2014; Zhang D., 2014]. Эти рецепторы были открыты при реализации проекта геном человека, а в последующем была установлена их значимая роль в регуляции биосинтеза инкретинов и углеводном обмене. Рецептор, получивший название GPR119, был открыт Робертом Фредрикссоном с соавторами в 1999 году, является трансмембранным, сопряжен с G белком и принадлежит к классу А (родопсинподобных). Его экспрессия обнаруживается преимущественно в поджелудочной железе и желудочно-кишечном тракте, а стимуляция приводит к увеличению секреции инкретинов [Fredriksson R., 2003; Overton H. A., 2006; Chu Z. L., 2007].

К настоящему времени соединения, проявляющие агонистическую активность в отношении GPR119, позиционируются как перспективные кандидаты для создания на их основе пероральных гипогликемических средств для длительного применения у больных СД2 [Спасов А. А., 2015; Kang S. U., 2013], около 10 подобных молекул проходят клинические испытания на пациентах с метаболическими заболеваниями, такими как СД2 и ожирение [Ritter K., 2016].

Цель исследования – провести доклиническую оценку перспективности разработки агонистов GPR119 на основе производных диарилоксиметилпиперидина в качестве противодиабетических препаратов для моно- и комбинированной терапии сахарного диабета, исследовать механизмы их антигипергликемического действия и некоторые плейотропные эффекты.

Задачи исследования:

1. Обосновать гипотезу, согласно которой стимуляция GPR119 перспективна в качестве разработки фармакотерапевтического подхода в лечении СД2, провести анализ литературы и патентный поиск соединений, обладающих агонистической активностью в отношении GPR119.

2. Используя технологии ADME и высокопроизводительного скрининга выявить соединения с высокой агонистической активностью к GPR119, провести скрининг среди производных диарилоксиметилпиперидина, проявивших высокую агонистическую активность в отношении рецептора GPR119 по выраженности гипогликемического действия на модели стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного сахарного диабета и изучить зависимость доза-эффект наиболее активного соединения.

3. В исследованиях *in vitro* изучить параметры растворимости, метаболической стабильности, кардиобезопасности, а в исследованиях *in vivo* острую токсичность при пероральном введении наиболее активного соединения на двух видах лабораторных животных обоих полов.

4. Провести сравнительный анализ выраженности гипогликемической активности наиболее активного агониста GPR119 и его комбинации с метформином и ситаглиптином на животных с экспериментальным сахарным диабетом, а также в условиях метаболических нарушений, вызванных переводом животных на высококалорийную и жирную пищу, их влияние на потребление пищи и массу тела.

5. Изучить механизмы гипогликемического действия наиболее активного агониста GPR119, определяя глюкозозависимую выработку ГПП-1, инсулина и глюкагона, а также его влияние на глюкозотолерантность и инсулинрезистентность.

6. Изучить плейотропные эффекты (эндотелио- и церебропротективные) наиболее активного соединения при моделировании нарушений мозгового кровообращения у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным сахарным диабетом.

7. Обосновать перспективность использования агонистов GPR119 рецепторов в качестве основы для создания нового класса противодиабетических препаратов.

Научная новизна работы

Впервые проведен целенаправленный поиск в ряду производных диарилокси метилпиперидина веществ, проявляющих агонистическую активность в отношении GPR119 и обладающих гипогликемической активностью. Выявлено наиболее активное и малотоксичное гипогликемическое вещество (ZB-16), на основе которого разработано новое лекарственное средство (дипиарон), по уровню агонистической активности превосходящее референтное вещество (Arenal19) и оказывающее гипогликемическое действие при пероральном введении животным с экспериментальным сахарным диабетом на уровне сопоставимом с метформином и превосходящем ситаглиптин.

Установлен глюкозозависимый характер гипогликемического действия исследуемого вещества и его способность значительно повышать концентрацию ГПП-1 и инсулина в крови экспериментальных животных. В экспериментах на старых (2-х летних) животных, содержащихся на высокоуглеводной и жировой диете, впервые показано влияние дипиарона на уровень глюкозы в крови, потребление пищи, массу тела, содержание липидов и функциональное состояние эндотелия. В аналогичном исследовании, но на молодых животных было также показано, что введение дипиарона предупреждает развитие ожирения у них, вызванное высоким содержанием углеводов и жиров в пище.

Впервые было установлено, что курсовое лечебное пероральное введение нового агониста GPR119 приводит к снижению выраженности экспериментального сахарного диабета, когнитивного дефицита и возникающей на его фоне эндотелиальной дисфункции.

Впервые проведены исследования плеiotропных эффектов наиболее перспективного соединения (ZB-16) и его комбинации с метформином. Впервые показано, что курсовое терапевтическое введение соединения ZB-16 и его комбинации с метформином животным с 28 дневным сахарным диабетом и острым или хроническим нарушением мозгового кровообращения снижает тяжесть психоневрологического и когнитивного дефицита, улучшает эндотелийзависимую вазодилатацию мозговых сосудов. С помощью морфологических исследований установлено, что соединение ZB-16 уменьшает размер некроза мозга и выраженность нейродегенеративных процессов в головном мозге.

Впервые показано, что курсовое пероральное введение агониста GPR119 улучшает морфофункциональное состояние поджелудочной железы у крыс с экспериментальным сахарным диабетом, что выражалось в большем количестве инсулинсекретирующих клеток, в меньшем содержании проапоптотического маркера апоптоза – каспаза-3 и увеличении пролиферативных процессов – маркером которых являлась активация белка Ki67.

Теоретическая и практическая значимость работы

В выполненной работе обосновано, что разработка и изучение агонистов GPR119 в ряду производных диарилокси метилпиперидина перспективна для создания на их основе средств лечения сахарного диабета и ожирения, которые помимо сахароснижающего обладают эндотелио- и церебропротекторным действием, снижают массу тела.

Проведенное в полном объеме доклиническое исследование специфической фармакологической активности и общей лекарственной безопасности соединения ZB-16 свидетельствует о наличии гипогликемической активности, сопоставимой с метформином и ситаглиптином, что позволяет рекомендовать данное вещество к проведению клинических испытаний.

Методология и методы диссертационного исследования

Исследуемые соединения были получены после анализа научной литературы и проведения патентного поиска среди веществ, проявляющих агонистическую активность к GPR119, путем высокопроизводительного скрининга и дальнейшей оценки параметров растворимости, стабильности, безопасности и агонистической активности в *in vitro* исследованиях и гипогликемического действия в условиях *in vivo*. Все исследования *in vivo* выполнены на крысах линии Wistar, острая токсичность соединения лидера дополнительно

определялась на нелинейных мышах. На каждом этапе исследования формировались контрольные группы животных. Гипогликемическое действие, влияние соединений на скорость утилизации глюкозы, массу тела, количество потребляемого корма и механизмы действия исследовали на животных с стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным сахарным диабетом и ожирением, развивающемся при замене стандартного рациона на высококалорийный и жирный. Церебропротективное действие соединения ZB-16 и его комбинации с метформином изучали на животных острым и хроническим нарушением мозгового кровообращения и стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным сахарным диабетом. Экспериментальные модели патологий были выбраны в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств [Спасов А.А., 2010; Миронов А. Н., 2012]. Для решения поставленных задач использовалось современное оборудование и высококачественные расходные материалы. Методы систематизации и статистической обработки полученных результатов соответствовали рекомендованным для проведения доклинических исследований.

Дизайн исследования и протокол были рассмотрены и одобрены отделом этической, правовой и социологической экспертизы в медицине Волгоградского медицинского научного центра [регистрационный номер: ИРБ 00005839 IORG 0004900 (OHRP)] 2 февраля 2014 г. (протокол № 191-2014).

Реализация результатов исследования

На основании результатов, полученных при выполнении исследования, предложена дальнейшая программа целенаправленного поиска соединений с гипогликемическими, церебро-, эндотелиопротекторными и снижающими массу тела свойствами среди новых агонистов GPR119.

Полученные результаты о гипогликемических, церебро- и эндотелиопротективных свойствах агониста GPR119 соединения ZB-16 включены в раздел учебных программ курса фармакологии на кафедрах фармакологии и биофармации ФУВ, фармакологии и биоинформатики, клинической фармакологии и интенсивной терапии ВолгГМУ. На основании результатов диссертационного исследования оформлены информационные письма, которые используются в учебном процессе и научной работе кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ, фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ, лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств НИИ фармакологии ВолгГМУ. По материалам настоящей работы получен патент Российской Федерации на изобретение.

Значительная часть диссертационного исследования выполнена в рамках доклинических исследований нового лекарственного средства, для лечения сахарного диабета, на основе агониста GPR119, разрабатываемого по государственному контракту с Минпромторгом РФ № 13411.1008799.154 от 24 июля 2013 года на выполнение научно-исследовательской и опытно-конструкторской работы (НИОКР) «Доклинические исследования лекарственного средства для лечения сахарного диабета 2 типа на основе агонистов GPR119 рецептора» Шифр «2.1 Диабет ГПР 2013», заключенному в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (утвержденной постановлением правительства РФ от 17.02.2011 г. № 91).

Положения, выносимые на защиту

1. Анализ литературных данных о роли инкретинов в поддержании гомеостаза глюкозы и проведенный патентный поиск агонистов GPR119 подтверждает перспективность разработки нового гипогликемического средства среди производных диарилоксиметилпиперидина.

2. Среди изученных агонистов GPR119 соединение ZB-16 сопоставимо по уровню агонистической активности с известными агонистами GPR119, не обладает кардиотоксичностью (по данным исследований *in vitro*), не ингибирует ни одну из изоформ цитохрома P450 (по данным исследований *in vitro*), не обладает общетоксическим действием (по данным исследования острой токсичности *in vivo*) и оказывает выраженное

гипогликемическое действие на животных с экспериментальным сахарным диабетом и ожирением сопоставимое по эффективности с метформином и ситаглиптином.

3. Сочетанное применение агониста GPR119 – соединения ZB-16 с метформином и в меньшей степени с ситаглиптином оказывает антигипергликемическое действие у животных с стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным сахарным диабетом при курсовом пероральном введении, а также уменьшает потребление пищи и массу тела у животных с ожирением.

4. Сочетанное применение соединения ZB-16 с метформином увеличивает гипогликемическое, эндотелио- и церебропротекторное действие соединения ZB-16.

5. Механизм гипогликемического действия соединения ZB-16 связан с его способностью глюкозозависимо повышать уровень ГПП-1 и инсулина в крови, увеличивать количество эндокриноцитов, вырабатывающих инсулин, предупреждать апоптоз и стимулировать регенерацию β -клеток поджелудочной железы.

6. Соединение ZB-16 оказывает церебро- и эндотелиопротективное действие, улучшая эндотелийзависимую вазодилатацию у животных с экспериментальным сахарным диабетом и ожирением.

7. Курсовое пероральное введение соединения ZB-16 и более выражено его комбинации с метформином животным с экспериментальным сахарным диабетом и хроническим нарушением мозгового кровообращения уменьшает тяжесть психоневрологического дефицита, сенсомоторных и морфологических нарушений, а при фокальной ишемии головного мозга у животных с сахарным диабетом уменьшает и размер зоны некроза мозга.

8. Представленные данные свидетельствуют о целесообразности разработки на основе агонистов GPR119 нового класса гипогликемических препаратов как средств профилактики и лечения сахарного диабета, метаболических нарушений и сосудистых осложнений, в том числе нарушений мозгового кровообращения.

Степень достоверности и апробации результатов

Экспериментальное исследование проводилось на достаточном количестве животных, с использованием валидных экспериментальных моделей патологий и методов оценки параметров, свидетельствующих об эффективности исследуемого соединения. Экспериментальные данные были получены на высокотехнологичном оборудовании, с использованием кондиционных химических реактивов и биологических материалов. Анализ результатов экспериментального исследования проводился с использованием методов статистики, выбираемых в зависимости от характера данных и задач экспериментов. Выявленные в ходе выполнения работы закономерности и различия между опытными и контрольными группами подтверждались результатами статистического анализа.

Публикации

По результатам диссертационной работы опубликована 21 научная статья в рецензируемых изданиях перечня ВАК Министерства образования и науки РФ. Получен 1 патент РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 287 страницах машинописного текста, иллюстрирована 18 таблицами, 77 рисунками, состоит из введения, обзора литературы (глава I), экспериментальной части (главы II-VII), обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, который включает 258 источника, из них отечественных 86, иностранных 172, содержит 31 приложение на 66 страницах.

Личный вклад автора

Вклад автора заключается в обосновании и выборе направлений исследования, планировании и проведении экспериментов, анализе, интерпретации и обсуждении полученных результатов, написании статей, подготовке их к публикации в научных изданиях. В экспериментальных исследованиях, выполненных в соавторстве, вклад автора является определяющим, состоящим в участии на всех этапах – от постановки задач, разработки

протоколов исследования, выполнения экспериментальных работ, обработки и анализа полученных данных, до представления результатов в виде отчетов, публикаций и докладов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен литературный обзор исследований, посвященных описанию этиологии и патогенезу, поиску и разработке новых лекарственных препаратов для лечения сахарного диабета, ожирения и метаболического синдрома. Приведен обзор исследований эффективности и объём реализации гипогликемических лекарственных средств, рекомендованных к применению при СД2 на территории РФ. Описаны основные направления в разработке новых лекарственных средств для лечения СД2, особое внимание уделено описанию роли системы инкретинов и препаратов, влияющих на ее функционирование с целью повышения эффективности гипогликемической терапии. Дана характеристика рецептора GPR119, как перспективной фармакологической мишени для создания новых гипогликемических лекарственных средств, приведены основные характеристики уже созданных агонистов этого рецептора, находящихся на различных стадиях до- и клинических исследований.

В главе 2 описаны материалы и методы, использованные в настоящем исследовании. Эксперименты проводились на конвенциональных линейных крысах (Wistar) и нелинейных мышах обоих полов, которые содержались в условиях вивария регламентируемых Приказом Минздрава России о надлежащей лабораторной практике, ГОСТом Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики, Рекомендациям ВОЗ, «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985)». Все исследования были одобрены Региональным независимым этическим комитетом. Животные были получены из филиала «Столбовая» ГУ НЦБМТ РАМН (Московская обл.), ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово»» РАМН (Ленинградская область) и содержались с учетом правил Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

В работе изучена гипогликемическая активность новых производных диарилокси-метилпиперидина под лабораторным шифром ZB. Производные диарилокси-метилпиперидина были выбраны в качестве объекта изучения на основе анализа данных гипогликемической и агонистической активности, полученных из открытых источников и с использованием технологии высокопроизводительного скрининга библиотеки, состоящей из более чем 1,5 млн молекул. В исследованиях *in vitro* их агонистическая активность (по возрастанию внутриклеточной концентрации цАМФ) в отношении GPR119 подтверждалась на иммортализованной клеточной линии CHO-K1 со стабильно экспрессированным человеческим рецептором GPR119 (hGPR119, тест-система Lance Ultra cAMP (Perkin Elmer)). Растворимость опытных соединений измеряли с помощью фильтровальной системы Millipore в универсальном буфере в присутствии 2% ДМСО при pH 2, 4 и 7. Метаболизм соединений изучали в микросомальной фракции печени в присутствии ко-факторов изоферментов цитохрома P450, отвечающих за I фазу катаболизма ксенобиотиков. Убыль тестируемого вещества в процессе 30 минутной инкубации определяли с помощью ВЭЖХ-МС/МС анализа. Тест-препараты в концентрации 0,5 мкМ инкубировали с микросомальной фракцией печени на шейкере при 37°C в присутствии НАДФН. Реакции останавливали во временных точках (0, 5, 10, 15, 30 минут) путем добавления ацетонитрила. После осаждения белков, с помощью масс-спектрометрии определяли количество оставшегося в супернатантах тест-препарата. Инкубацию проводили в биологических повторностях, затем делали по 2 измерения для каждой пробы. Рассчитывали время полураспада ($T_{1/2}$), клиренс *in vitro* (CL_{int}) и оставшееся количество вещества (% от начального). Тестирование на ингибирование цитохромов 3A4, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 проводили в соответствии с протоколом производителя Invitrogen – Vivid CYP450 screening kit protocol O-13873-r1 US 0405 в 384-луночном формате. Исследуемые вещества 15 минут предварительно инкубировали с цитохромом в присутствии регенерирующей системы. Затем реакцию инициировали путем добавления в смесь НАДФ+ и специфического субстрата, который после

расщепления ферментом способен флуоресцировать. После определенного времени (10–45 мин) добавляли стоп-реагент и измеряли флуоресценцию продукта реакции, пропорциональную активности цитохрома. Вещества и контрольный ингибитор тестировали в 8 концентрациях в диапазоне концентраций 0,0046–10 мкМ, в двух повторах. Максимальная активность фермента – в присутствии 1% ДМСО, без веществ. Минимальный сигнал – при инкубации без фермента. В качестве контролей использовали известные специфические ингибиторы изоферментов цитохрома P-450, рекомендованные в протоколе фирмы Invitrogen. Исследование клеточной токсичности осуществляли с использованием иммортализованной эпителиальной линии клеток печени HepG2. Определение кардиотоксичности проводили по оценке влияния субстанции на hERG K⁺ ионный канал *in vitro* с помощью тест-системы Invitrogen® Predictor™ hERG.

После подтверждения агонистической активности соединений, определения параметров их растворимости, метаболизма и клеточной токсичности, в исследовании *in vivo* на интактных и крысах с экспериментальным сахарным диабетом (внутрибрюшинно стрептозотоцин 65 мг/кг + никотинамид 230 мг/кг) определялась гипогликемическая активность опытных соединений при их 28 дневном пероральном введении животным в дозах 0,1, 1 и 10 мг/кг. Гипогликемическую активность определяли на 14 и 28 дни лечения по изменению концентрации глюкозы в крови измеренной натошак и по скорости ее утилизации при проведении перорального теста толерантности к глюкозе (ПТТГ) (пероральное введение 40% раствора глюкозы в дозе 3 г/кг). Концентрацию глюкозы определяли портативным глюкометром Contour TS (Bayer, Германия) через 6 часов после пищевой депривации, 30, 60 и 120 минут после пероральной глюкозной нагрузки. По результатам исследования гипогликемической активности производных диарилоксиметилпиперидина было выделено соединение-лидер и его наиболее эффективная доза (1 мг/кг), которому было присвоено рабочее название Дипиарон.

Влияние дипиарона на массу тела оценивалось в двух экспериментальных сериях, в которых у старых и молодых животных вызвали развитие ожирения, обусловленное увеличением содержания в пище жиров и углеводов. Стандартный рацион животных заменялся на сливочное масло (жирность 8,5%; калорийностью 748 ккал/100 г), подсолнечную халву (532 ккал/100 г) и подсолнечный козинак (576 ккал/100 г), питьевую воду заменяли на 10% раствор фруктозы. Дипиарон вводили курсом в первой серии – перорально в дозе 1 мг/кг старым животным с ожирением (лечебное введение), а во второй – молодым животным одновременно с заменой корма на высококалорийный и жирный (профилактическое введение). Во второй серии экспериментов дипиарон вводился в том числе и в комбинации с метформином (400 мг/кг) и ситаглиптином (5 мг/кг). Регистрировалось изменение массы тела животных, количество потребляемой ими воды и пищи определялось при помещении животных в метаболические камеры («TECNIPLAST», Италия). Концентрацию глюкозы в крови и скорость ее утилизации при ПТТГ определяли портативным глюкометром, содержание липидов в крови набором для определения содержания липидов в крови Агат-М (Россия). Выраженность эндотелиальной дисфункции определялось путем оценки вазодилатирующей функции эндотелия мозговых сосудов по методическому подходу, предложенному Тюренковым И. Н., Воронковым А. В. (2008), который заключался в анализе изменений уровня мозгового кровотока в ответ на введение различных модификаторов синтеза эндогенного оксида азота (ацетилхолина 0,01 мг/кг, Acros organics, США; нитро-L-аргинина метиловый эфир, 10 мг/кг, L-NAME, Acros organics, США). Количество десквамированных эндотелиоцитов определяли в камере Горяева.

Оценка церебропротективного действия дипиарона проводилась на моделях острого (на фоне 4 недельного СД) и хронического (моделирование за 5 дней до СД) нарушения мозгового кровообращения (НМК). Острое НМК моделировалось путем транзиторной (30 минут) окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА), а хроническое НМК путем 50% стенозирования общих сонных артерий (хирургические манипуляции проводились под общей анестезией (хлоралгидрат 400 мг/кг или золетил 10 мг/кг и ксилазин 5 мг/кг, внутрибрюшинно)). Неврологический дефицит у животных оценивали с использованием следующих шкал stroke-index McGraw в модификации И. В. Ганнушкиной (1996), 9-балльной шкале Combs и D'Alecy

[Combs D. J., 1987] и шкале Garcia [Дайнеко А.С., 2014; Garcia J. H., 1995]. Координацию движений и мышечный тонус животных изучали также в тесте «Rota-Rod» (установке производства ООО «Нейроботикс», Россия) [Bohlen M., 2009]. Чувствительность передних конечностей и их мелкую моторику оценивали в адгезивном тесте [Bouet V., 2009; Freret T., 2009]. Для изучения влияния соединений на поведение, а также когнитивные и мнестическую функции проводили стандартные психофармакологические тесты: «Открытое поле-круг» (ОП), «Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ), «Тест экстраполяционного избегания» (ТЭИ) [Воронина Т.А., 2000, 2012; Островская Р.У., 2012]. Регистрация уровня локального мозгового кровотока осуществлялась методом лазерной доплерографии (Biorac Systems Inc., США). Изучение вазодилатирующей функции эндотелия мозговых сосудов проводилось по методу, описанному выше. Изучение параметров коагуляционного компонента гемостаза (определение тромбинового, протромбинового, активированного частичного тромбопластинового времени и содержания фибриногена) осуществляли хронометрически на анализаторе показателей гемостаза АПГ2-01 «МИНИЛАБ 701» («Юнимед», Россия) с использованием наборов реактивов производства НПО «Ренам» (Россия). Кровь для анализа забирали из брюшной аорты, все анализы проводились на бедной тромбоцитами плазме, полученной после центрифугирования образцов цитратной крови при 3000 об/мин в течении 15 минут [Баркаган З. С., 2001]. Количественную оценку размера некроза мозговой ткани выполняли путем анализа цифровых фотографий срезов мозга, обработанных 1% раствором 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида [Brait V. H., 2010]. Головной мозг животных с ХНМК и СД забирали после их эвтаназии (хлоралгидрат 800 мг/кг, внутривенно), морфометрию и гистологическое исследование тканей проводили при окрашивании срезов по Нисслию [Снигур Г. Л., 2010, Sun G., 1997].

Влияние дипиарона на секрецию ГПП-1 и инсулина анализировали при его пероральном введении интактным и животным с СД до и через 15 минут после глюкозной нагрузки (глюкоза 3 г/кг перорально в виде 40% раствора). Концентрацию ГПП-1 и инсулина определяли в образцах сыворотки методом твердофазного ИФА с использованием ИФА тест-систем соответственно «Mercodia Rat Insulin ELISA» (Mercodia AB, Швеция) и Rat glucagon-like peptide-1 (GLP-1) ELISA Kit (Cusabio, Wuhan, China) в соответствии с рекомендациями изготовителя на фотометре-анализаторе SUNRISE («TECAN», Австрия).

Иммуногистохимическое исследование содержания инсулина в ткани поджелудочной железы проводили при окрашивании парафиновых срезов гематоксилином и эозином по общепринятым методикам [Снигур Г. Л., 2010, Sun G., 1997] и с использованием мышиных моноклональных антител к инсулину (клон 1G4, GeneTex) в разведении 1:100. Для изучения апоптоза β -клеток использовали первичные антитела против каспазы 3 (мышиные моноклональные антитела, клон 3F49, GeneTex) в разведении 1:50, а для определения пролиферативной активности использовали первичные антитела к белку Ki-67 (кроличьи поликлональные антитела, LifeSpan BioSciences) в разведении 1:50. Данный вид исследования выполняется по стандартным протоколам в соответствии с инструкциями фирм производителей реактивов. Для визуализации использовали полимерную систему EnVision (Thermo Scientific, Fremont, CA); хромогендиамино-бензидин. Морфометрическое исследование проводили с помощью компьютерной программы «Видео Тест-Морфо-4» (Россия). Определяли периметр панкреатических островков (L, мкм) и их площадь (S, мкм²). Экспрессию инсулина в β -клетках оценивали путем определения абсолютной и относительной площади иммунореактивного материала. Оценка результатов иммуногистохимической реакции осуществлялась по интенсивности окраски с использованием полуколичественной шкалы (негативная, слабая, умеренная, выраженная).*

Острую токсичность при однократном введении изучали на мышах и крысах обоего пола массой 18–22 и 180–220 г соответственно. Соединение вводили животным внутрижелудочно в

* Исследование выполнено совместно с зав. кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО ВолгГМУ, д.м.н, профессором А.В. Смирновым и к.м.н. доцентом М.В. Шмидт, за что выражаем искреннюю благодарность

возрастающих дозах однократно. Наблюдение за животными вели в течение последующих 14 суток.

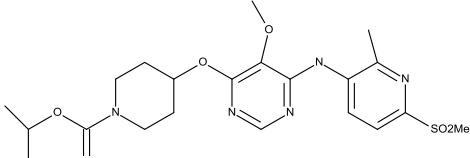
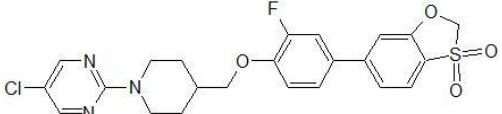
В качестве препаратов сравнения и для совместного с дипиароном перорального введения на различных этапах исследования были использованы: метформин – 400 мг/кг [Ismail T.A., 2015], ситаглиптин – 5 мг/кг [Vaghasiya J., 2011], при изучении нейропротекторных свойств цитиколин – 500 мг/кг [Парфенов В.А., 2009], которые вводились по аналогичной схеме и способом (1 раз в сутки перорально в виде водной суспензии или раствора) после моделирования нарушений мозгового кровообращения.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакетов следующих программ: Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, США), Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США), Prism 6 (GraphPad Software Inc., США). Для проверки распределения на нормальность использовали критерий Шапиро-Уилка. В зависимости от характера данных использовали следующие методы статистического анализа: однофакторный дисперсионный анализ (One-Way ANOVA) либо ранговый однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с последующим применением апостериорных (post hoc) критериев (t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони либо критерия Данна). Статистически значимыми расценивались различия при $p < 0,05$ [Гланц С., 1999; Реброва О. Ю., 2006].

В главе 3[†] представлена последовательность разработки агонистов GPR119 на основе производных диарилloxиметилпиперидина. В начале работы на основании выборочного высокопроизводительного скрининга библиотеки, включающей более 1,5 млн молекул и анализа находящихся в открытом доступе структур известных агонистов GPR119 была спроектирована (*in silico*) и синтезирована молекула пригодная для последующей модификации с целью оптимизации ее фармакокинетических и фармакодинамических характеристик (растворимость, устойчивость к микросомальным ферментам). Несколько соединений были синтезированы в ходе последовательного подбора биоизостерного заместителя для третбутил-оксикарбонильной группы или ее заменой на изопропил-оксикарбонильную (соединение ZB-17) или трифторэтильную (соединение ZB-18), или введение хлорпиримидинового заместителя у атома азота вместо уретанового (соединение ZB-16). Соединения ZB-19 и ZB-20 были синтезированы путем замены фторфенила в средней части молекулы на или торцевой третбутил-оксикарбонильной группы хлорпиримидином. Аналитические данные показывают, что все синтезированные соединения имеют высокую агонистическую активность в отношении GPR119. При этом замена третбутил-оксикарбонильной группы ее возможными биоизостерами не привела к существенному снижению активности (за исключением некоторого снижения в случае трифторэтильной группы) Структуры полученных соединений и их агонистическая активность представлена в таблице 1.

Таблица 1

Структура и активность исследуемых соединений

Шифр соединения	Структура	Макс. конц. (нМ)	EC ₅₀ М
Arena (0119)		10	9,01 нМ
ZB-16		30	7,25 нМ

[†] Исследование выполнено совместно ЦВТ «ХИМРАР», за что выражаем искреннюю благодарность генеральному директору, доктору химических наук Д.В. Кравченко и всем сотрудникам.

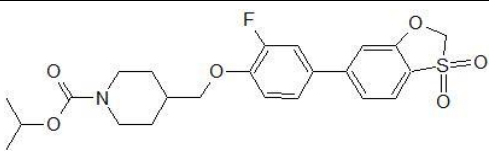
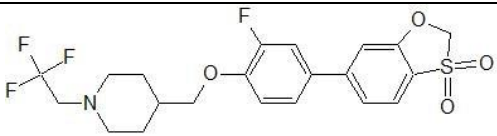
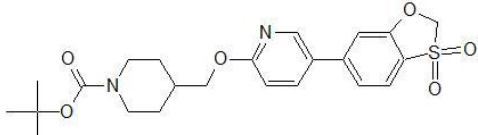
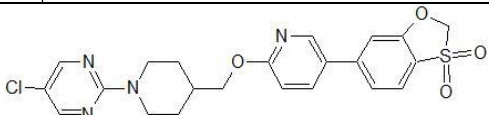
ZB-17		30	12,5 нМ
ZB-18		30	63,5 нМ
ZB-19		30	11,0 нМ
ZB-20		30	29,3 нМ

Таблица 2

Гипогликемическое действие агонистов GPR119 на интактных крыс (однократное пероральное введение)

Группа	Кол-во животных	Доза, мг/кг	Начальный уровень глюкозы, (ммоль/л)	Время после введения вещества, мин		
				60	120	180
Интакт	10	-	3,63 ± 0,2	3,58 ± 0,2 -1,4%	3,74 ± 0,2 +3%	3,62 ± 0,2 -0,3%
ZB-16	10	0,01	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,1 -3%	3,4 ± 0,1 +3%	3,36 ± 0,2 +1,8%
	10	0,1	3,6 ± 0,2	3,1 ± 0,2 -13,9%	3,21 ± 0,2 -10,8%*	3,22 ± 0,2 -10,6%*
	10	1	3,7 ± 0,2	3,4 ± 0,1 -8,1%	3,3 ± 0,2 -10,8%*	3,3 ± 0,2 -10,8%*
	10	10	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1 -2,9%	3,6 ± 0,1 -2,9%	3,3 ± 0,1 -5,7%
ZB-17	10	0,1	3,8 ± 0,2	3,9 ± 0,1 +2,6%	4,1 ± 0,2 +7,9%	3,8 ± 0,1 0%
	10	1	4,1 ± 0,2	3,9 ± 0,2 -4,9%	3,9 ± 0,2 -4,9%	3,7 ± 0,2 -9,8%*
	10	10	4,2 ± 0,1	3,7 ± 0,2 -11,9%	3,9 ± 0,1 -7,1%	3,7 ± 0,1 -11,9%*
ZB-18	10	0,1	4,3 ± 0,3	4,4 ± 0,3 +2,3%	4,2 ± 0,4 -2,3%	4,5 ± 0,4 +4,7%
	10	1	4,2 ± 0,2	4,1 ± 0,2 -2,4%	3,9 ± 0,2 -7,1%	4,0 ± 0,2 -4,8%
	10	10	4,1 ± 0,2	4,0 ± 0,2 -2,4%	3,8 ± 0,2 -7,3%	3,9 ± 0,2 -4,9%
ZB-20	10	0,1	4,0 ± 0,3	3,8 ± 0,3 -5%	3,7 ± 0,3 -7,5%	3,6 ± 0,3 -10%
	10	1	3,9 ± 0,2	3,8 ± 0,2 -2,6%	3,6 ± 0,3 -7,7%*	3,5 ± 0,2 -10,3%*
	10	10	4,0 ± 0,1	3,7 ± 0,2 -7,5%	3,5 ± 0,2 -12,5%*	3,5 ± 0,2 -12,5%*

Примечание: * -различия статистически значимы с группой интактных животных $p < 0,05$

На следующем этапе исследования у синтезированных соединений оценивали гипогликемическую активность при пероральном введении животным с стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным сахарным диабетом. Все соединения вводились в трех дозах 0,1, 1 и 10 мг/кг перорально, ежедневно в течение 28 дней. ПТТГ проводили на 0, 7, 14 и 28 дни после начала лечения. Значения площади под кривой (AUC_{0-120}) «концентрация глюкозы-

время», отражающие тяжесть нарушений углеводного обмена или эффективность проводимой терапии представлены на рисунке 1.

При анализе результатов данного блока исследования было отмечено, что наиболее выраженным гипогликемическим действием обладает соединение ZB-16 в дозе 1 мг/кг, курсовое, пероральное введение которого эффективнее других соединений компенсировало нарушения утилизации глюкозы. При этом выраженность гипогликемического действия у него была сопоставима или незначительно уступала метформину и превосходила таковую у ситаглиптина. Остальные исследуемые агонисты значимо улучшали ($p < 0,05$) утилизацию глюкозы у животных после 7 (ZB-18), 14 (ZB-18, ZB-19) и 28 (ZB-17, ZB-18, ZB-19, ZB-20) дней перорального введения. Соединение ZB-16 в дальнейших исследованиях упоминается под рабочим названием дипиарон.

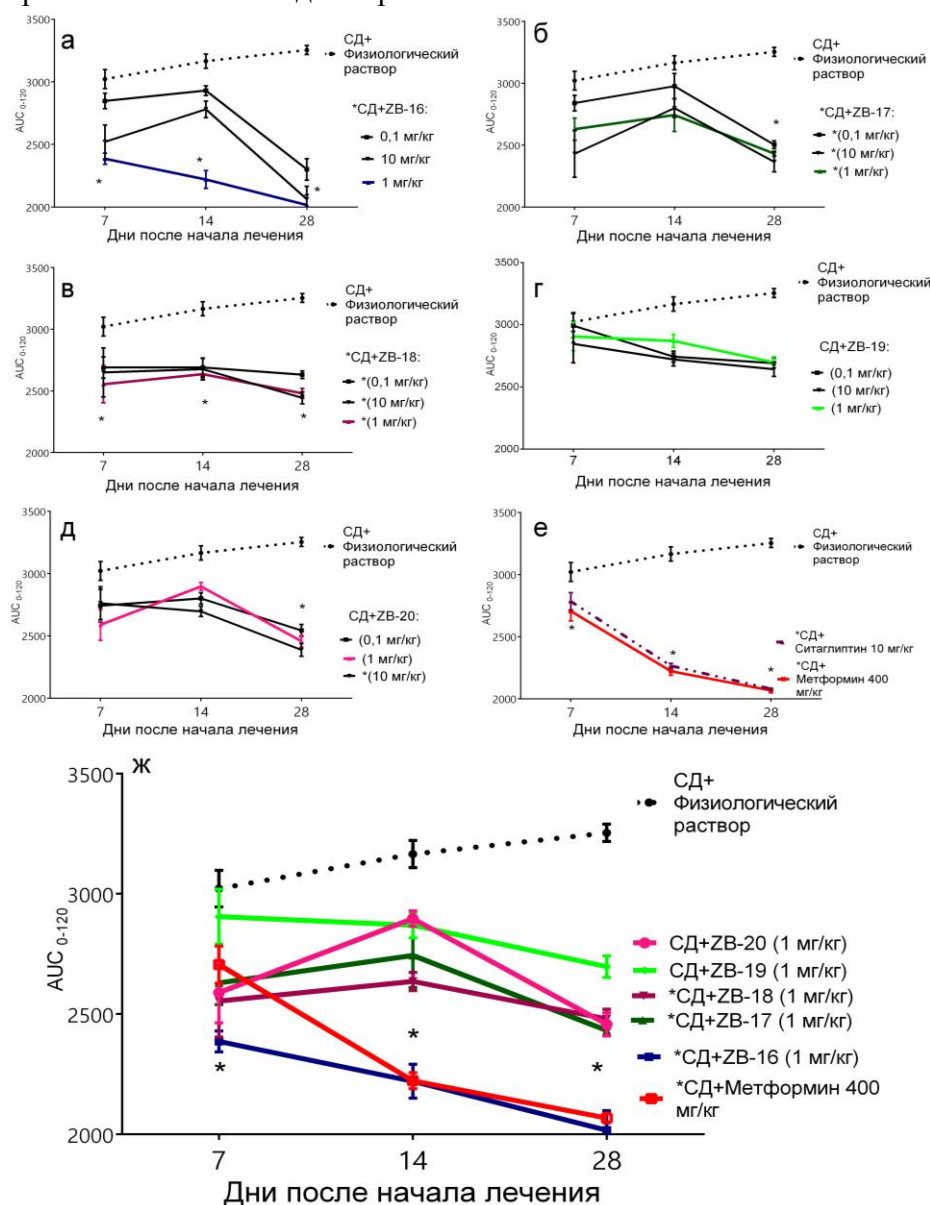


Рис. 1. Значение площади под кривой «уровень гликемии-время» при проведении ПТТГ у животных с экспериментальным СД на 7-й, 14-й и 28-й день после начала лечения соединениями ZB-16 (А), ZB-17 (Б), ZB-18 (В), ZB-19 (Г), ZB-20 (Д), препаратами сравнения (Е) и в дозе 1 мг/кг (Ж). Примечание: * – различия достоверны по отношению к группе СД+физ.р-р ($p < 0,05$)

Острую токсичность дипиарона исследовали на мышах (самцах и самках массой 18-22 г) и крысах (самцах и самках массой 180–220 г) [Миронов А. Н., 2012]. Субстанцию дипиарона вводили однократно, энтерально в максимально допустимых объемах растворителя (2000 мг/кг (практически нерастворимая доза вещества, принятая за ЛД₅₀)), через атравматический металлический зонд. Наблюдения за животными производили в течение 14 дней, при этом было отмечено удовлетворительное внешнее состояние животных, отсутствие признаков токсического действия или гибели, что позволило отнести тестируемое вещество к классу малотоксичных.

Глава 4.[‡] В клинических условиях гипогликемические препараты редко применяются изолированно, поэтому при разработке нового лекарственного средства целесообразно оценивать его эффективность как при монотерапии, так и при комбинированном применении.

На первом этапе был проведен рескрининг гипогликемической активности дипиарона при его пероральном введении в сравнении с референтным препаратом – ситаглиптином. Затем, в 2 независимых экспериментальных сериях эффективность 4-недельного перорального введения дипиарона сравнивалась с аналогичным по кратности введением его комбинации с метформином или ситаглиптином. На следующем этапе исследования была оценена эффективность применения дипиарона в дозах 0,1 и 1 мг/кг в комбинации с препаратом метформин (400 мг/кг). Данная серия проводилась с целью экспериментального обоснования целесообразности сочетанного применения дипиарона и метформина в 2 режимах дозирования агониста. Все эксперименты проводились на животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД.

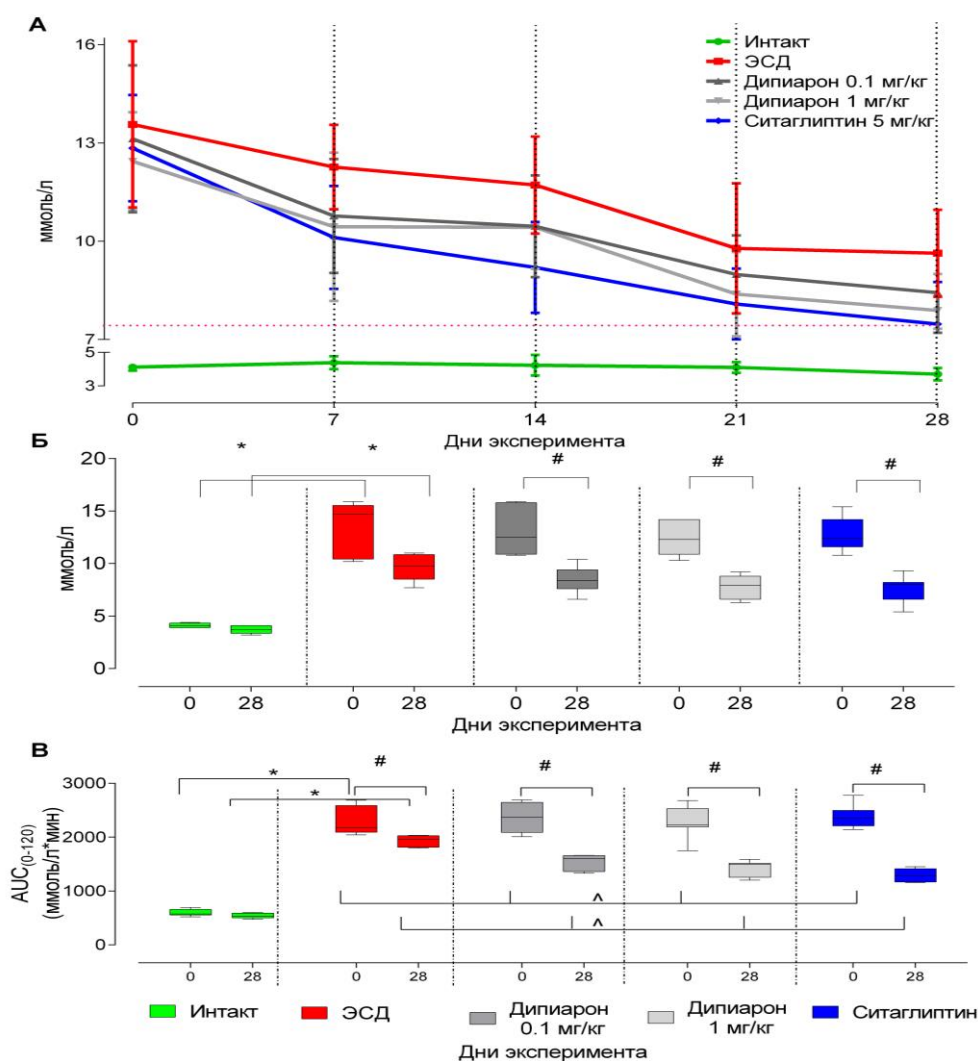


Рис. 2. Изменение концентрации глюкозы на протяжении всего периода лечения (А), до и через 4 недели лечения (Б), а также результаты ПТТГ до и после «лечения» (В).

Примечание:

* - различия достоверны по отношению к группе интакт;

- различия до и после лечения достоверны;

^ - различия достоверны по отношению к группе ЭСД; пост-хок теста Даннета

В ходе 4-недельного наблюдения за животными с экспериментальным сахарным диабетом (ЭСД) и получавшими дипиарон было отмечено, что его ежедневное пероральное введение дозозависимо и на сопоставимом с ситаглиптином уровне снижает концентрацию глюкозы в крови. Терапевтическое 4-недельное введение дипиарона в обеих дозах и препарата ситаглиптин эффективно компенсировало нарушения углеводного обмена у экспериментальных животных, повышая скорость утилизации глюкозы в ходе проведения

[‡] Исследования выполнены совместно с к.м.н. Бакулиным Д.А. и Логвиновой Е.А.

ПТТГ, на 35,4; 37,7 и 46% относительно значений, зафиксированных до начала лечения и на 17,7; 23,5 и 31,2% относительно показателей контрольной группы (рис.2).

Далее на животных с аналогичной моделью ЭСД, мы сравнили эффективность дипиарона с референтными препаратами и его комбинаций с ними. Доза дипиарона при моно- и комбинированном введении была 1 мг/кг. Для оценки влияния изучаемых веществ на уровни глюкозы измеряли ее плазменные концентрации у животных до моделирования ЭСД (-3 день, рис.3 А), до (0 день, рис.3А) через 7, 14, 21 и 28 дней после начала терапии (рис.3А). скорость утилизации глюкозы определяли при проведении ПТТГ через 2 и 4 недели после начала лечения (рис.3В).

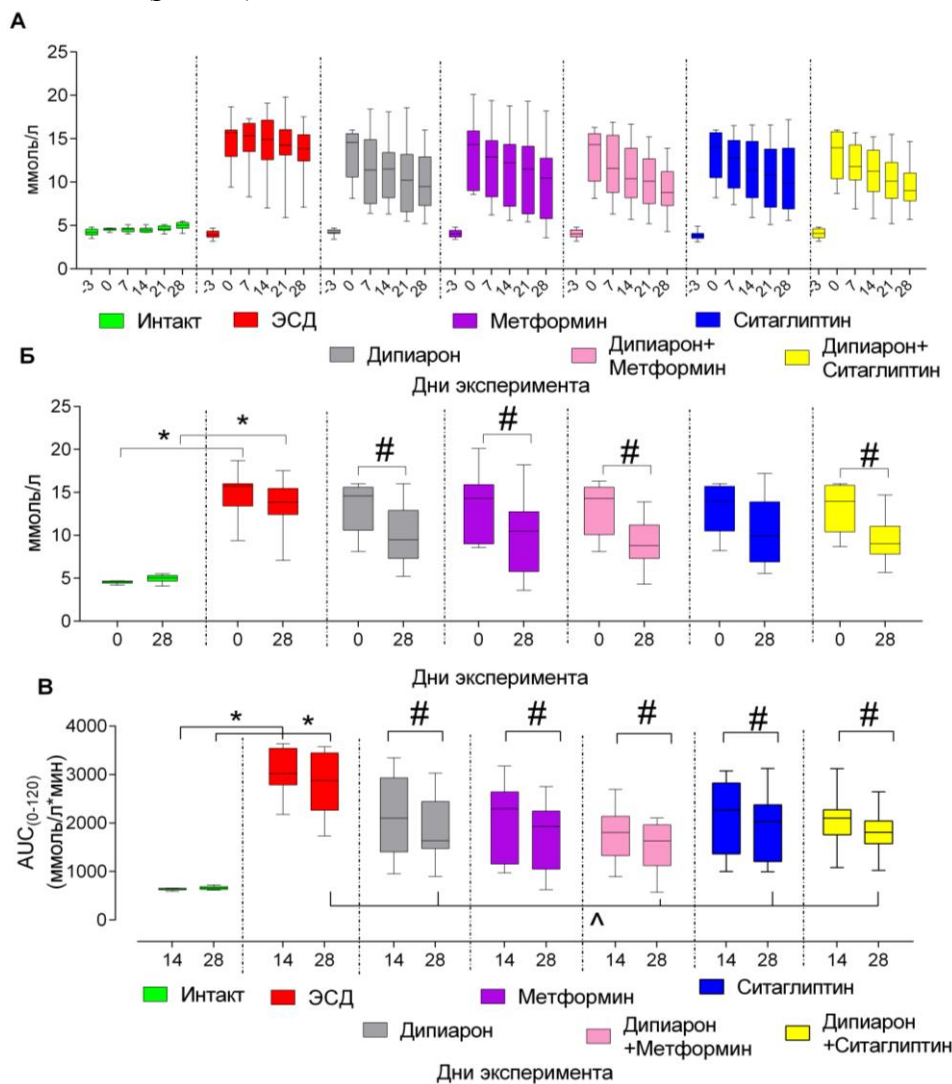


Рис. 3. Изменение концентрации глюкозы на протяжении всего периода «лечения» (А), до и через 4 недели лечения (Б), а также результаты ПТТГ через 14 и 28 дней лечения (В). Примечание: обозначения, как на рисунке 2

Через 7 дней после моделирования экспериментального СД в группе животных, не получавших «лечение», концентрация глюкозы в крови превышала значения, зафиксированные до введения стрептозотоцина, почти в три раза и составляла в среднем $14,6 \pm 0,6$ ммоль/л. У животных, которым ежедневно перорально вводили дипиарон и его комбинации с метформином, концентрация глюкозы в крови была статистически значимо ниже и составляла в среднем $12,3 \pm 0,8$ и $12,2 \pm 0,7$ ммоль/л. Через 14 дней после начала «терапии» было отмечено, что концентрация глюкозы в крови животных, не получавших «лечения», составила в среднем $14,3 \pm 0,6$ ммоль/л, а у животных, получавших дипиарон, его комбинацию с метформином или ситаглиптином, а также референтные препараты изолированно – $12 \pm 0,9$; $10,9 \pm 0,7$; $11,3 \pm 0,5$; $11,7 \pm 0,8$; $11,8 \pm 0,6$ ммоль/л соответственно, указанные различия были достоверными. Через 2 недели после начала «терапии» всем животным проводился ПТТГ, в результате которого было отмечено, что у животных, получавших «лечение» дипиароном, его комбинациями или референтными препаратами по отдельности, скорость утилизации глюкозы была выше и

достоверно отличалась от значений контрольной группы на 40,5%; 32%; 30,8%; 25,7% и 25% соответственно.

Через 3 недели после начала «терапии», различия в концентрациях глюкозы в крови становились более значимыми, что указывает на эффективность проводимой терапии. Так, концентрация глюкозы в крови животных, не получавших «лечение», относительно начальных значений снизилась только на 5%, а у животных, которые получали дипиарон, метформин, ситаглиптин и их комбинации с дипиароном этот показатель снизился на 19,4%; 19,2%; 18,7%; 25% и 23,2% соответственно.

Через 4 недели «терапии» ЭСД минимальные значения концентрации глюкозы натощак фиксировались в группе, получавшей комбинацию дипиарона с метформином ($9,2 \pm 0,6$ ммоль/л) или ситаглиптином ($9,5 \pm 0,5$ ммоль/л), что было на 32,2% и 29,3% меньше, чем у животных, не получавших «лечения». В группе, получавшей дипиарон, метформин или ситаглиптин концентрация глюкозы в крови была на 25,5%; 27,2% и 20,6% меньше, чем в контрольной. Скорость утилизации глюкозы при проведении ПТТГ была значительно выше в группах, получавших комбинированную терапию, о чем свидетельствует показатель площади под кривой «концентрация глюкозы-время». В группе, животные которой в течение 4 недель получали дипиарон с метформином, этот показатель был на 45,6 и 35,4% меньше, чем в группе без «лечения», а в группах, получавших дипиарон, метформин и ситаглиптин изолированно, площадь под кривой «концентрация глюкозы-время» была ниже значений контрольной группы на 33,7; 38,3 и 30,7% соответственно.

Различия в значениях концентрации глюкозы, измеренной натощак и скорости ее утилизации при проведении ПТТГ, были статистически значимы не только между группами, получавшими лечение и контрольной «не получавшей», но и при их сравнении «до – после» лечения (рис.3 Б), а также на 14 и 28 день терапии (рис.3В)

Таким образом, гипогликемическое действие дипиарона является дозозависимым и увеличивается при его комбинировании с метформином. Мы решили целесообразным оценить гипогликемическое действие дипиарона в дозах 0,1 и 1 мг/кг при комбинировании с метформином в дозе 400 мг/кг. Эксперимент проводился на модели ЭСД аналогичной предыдущим.

Сравнение концентраций глюкозы в крови животных с ЭСД, которые не получали «лечение» с теми, кому перорально вводили дипиарон (в обеих дозах), метформин и их комбинации, пост-хок тестом Даннета показало, что достоверными различия были только спустя 28 дней лечения. Наиболее выражено этот показатель различался в группах животных с ЭСД, получавших плацебо и комбинированную терапию (в течение 28 дней), причем эффективность не зависела от дозы, в которой дипиарон входил в комбинацию (рис.4).

Скорость утилизации глюкозы под влиянием проводимой терапии менялась более выражено, и уже через 14 дней после ее начала достоверно отличалась от зафиксированной в группе с ЭСД без «лечения». Спустя 28 дней «терапии» значимость различий между группами, получавшими исследуемые препараты и физиологический раствор, увеличивалась, что свидетельствует об эффективности лечения. Таким образом, комбинированная терапия (вне зависимости от дозы дипиарона, в которой он входил в состав комбинации) была более эффективной, чем каждое их веществ, вводимых по-отдельности.

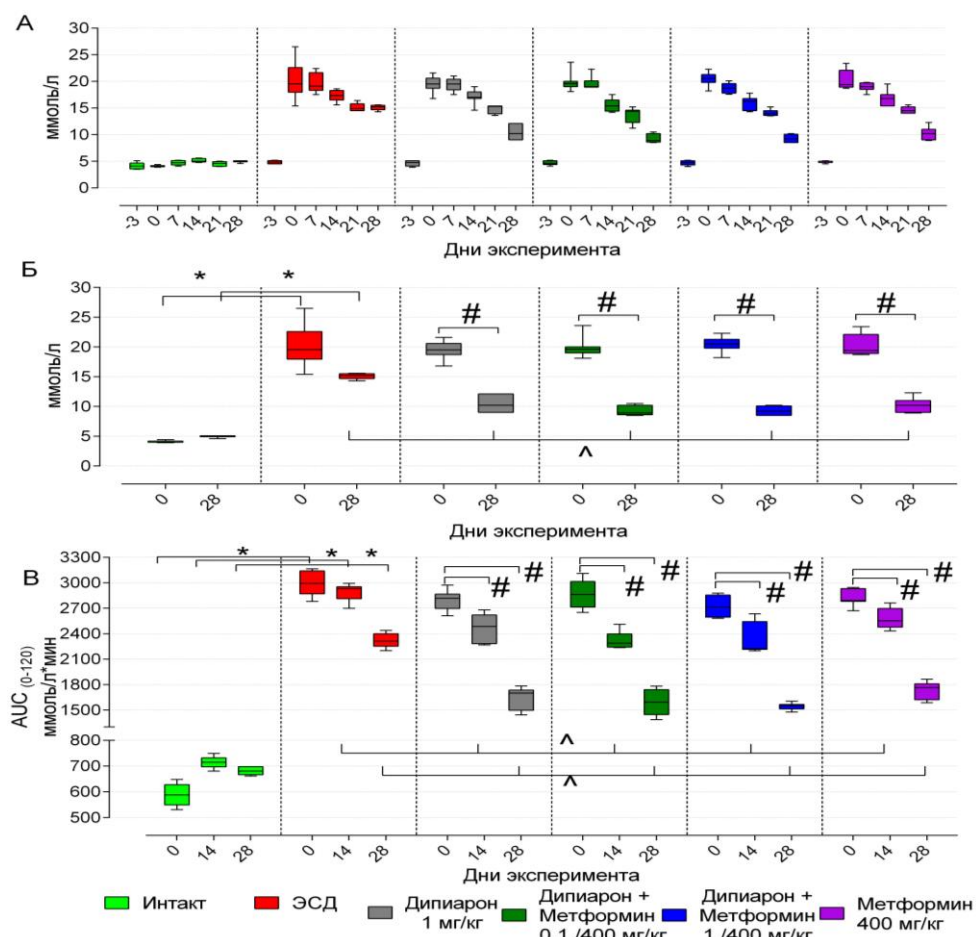


Рис. 4. Изменение концентрации глюкозы на протяжении всего периода лечения (А), до и через 4 недели лечения (Б), а также результаты ПТТГ через 14 и 28 дней лечения (В).

Примечание: обозначения, как на рисунке 2

В главе 5 отражены результаты изучения эффективности дипиарона на животных, содержащихся в условиях высокожировой и калорийной диеты.

Взаимосвязь ожирения и СД2 в настоящее время очевидна. Ожирение, как правило, предшествует диабету, но нередко возникает и после его манифестации, значительно отягощая состояние пациента и ухудшая прогноз заболевания. Наиболее доступные противодиабетические лекарственные средства (препараты сульфонилмочевины, тиазолидиндионы, инсулин и его аналоги) при применении пациентами увеличивают их массу тела, что нежелательно или недопустимо при сопутствующем избыточном весе или ожирении. Способность инкретинов регулировать аппетит в настоящее время установлена [Cabou C., 2011; Campbell J. E., 2013]. GPR119 играет важную роль в секреции инкретинов, а в экспериментальных исследованиях пероральное введение его агонистов снижает аппетит [Oyama J., 2014]. Можно ожидать, что применение дипиарона у животных с избыточной массой тела будет способно ее снижать или препятствовать увеличению. Поскольку ожирение, обусловленное диетой, легче вызвать у старых животных (меньшая естественная подвижность, сниженный гормональный фон и т.д.), исследование проводилось на старых крысах (возраст до начала эксперимента был 20–21 мес.; дизайн исследования схематично представлен на рис.5).

Содержание животных в течение 3 месяцев на высокожировой и высококалорийной диете привело к увеличению их массы тела в среднем на 18% ($p < 0,05$, по отношению к начальным значениям). Масса тела животных, получавших плацебо через месяц «лечения» увеличилась в среднем еще на 4,6%, а у тех, которым вводили дипиарон или метформин, наоборот, снизилась на 4,0 и 4,8% соответственно (рис.6).

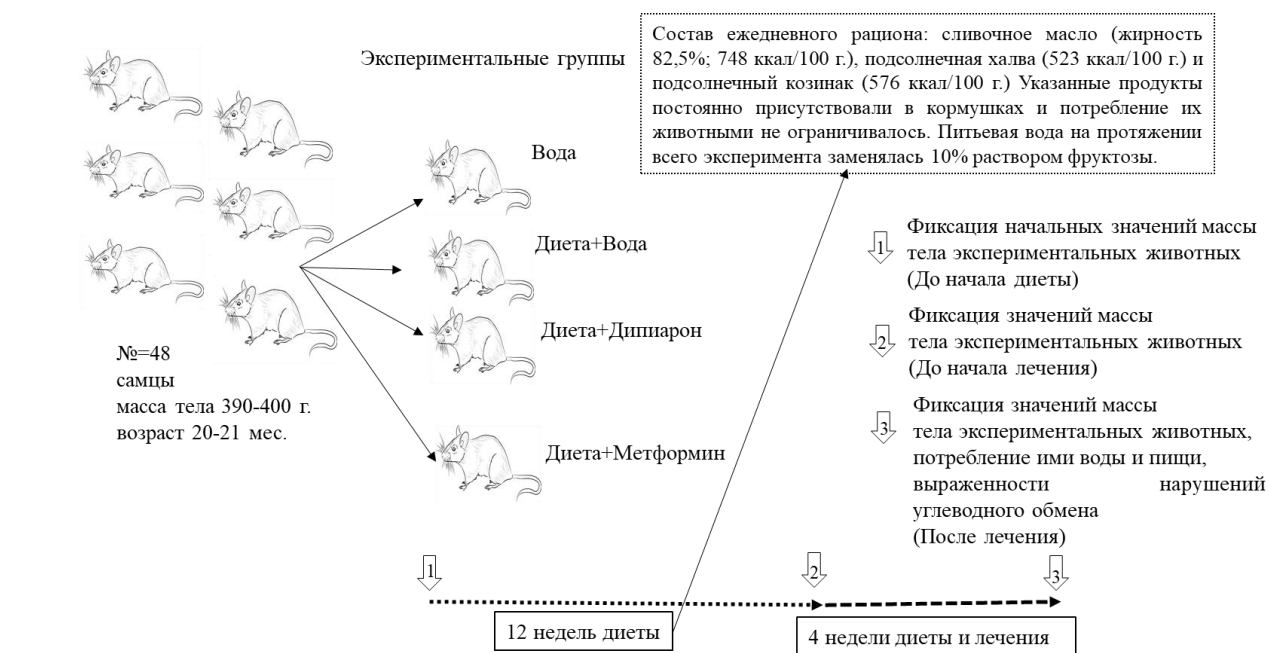


Рис. 5. Дизайн изучения влияния перорального введения ZB-16 и метформина на некоторые метаболические показатели животных

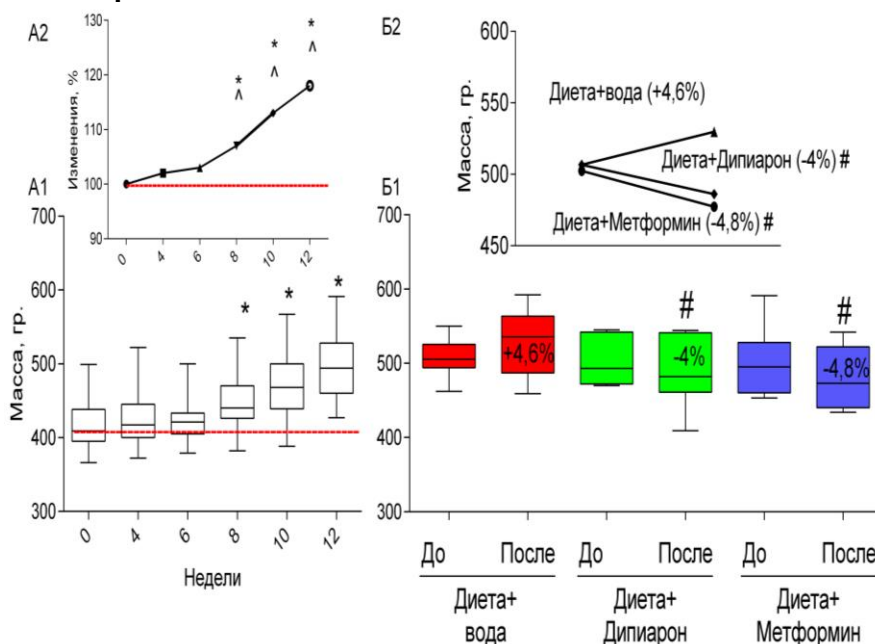


Рис. 6. Динамика массы тела животных (A1, A2), а также влияние лечения (B1, B2).

Примечание: «Горизонтальная красная линия» - значения интактной группы; «^» - $p < 0,05$ при сравнении со значениями интактной группы; «*» - $p < 0,05$ при сравнении с исходными значениями; «#» - $p < 0,05$ при сравнении со значениями группы Диета+вода

У животных, получавших дипиарон, отмечалась четкая тенденция к уменьшению количества потребляемого корма (рис.7, А) по сравнению с крысами, получавшими плацебо.

На следующем этапе мы определяли уровень глюкозы крови натощак и толерантность к глюкозе при проведении ПТТГ (рис.8). Содержание животных в течение 3 месяцев в условиях высокожировой и углеводной диеты не приводило к возникновению гипергликемии натощак (рис.7, Б), но уровень глюкозы, измеренный после 6-часового голодания у животных, получавших дипиарон и метформин был несколько ниже (рис.7, Б). Через 2 часа после перорального введения глюкозы ее концентрация в крови животных получавших плацебо была выше, чем у животных, получавших метформин и дипиарон (рис.8, А). Изменения в скорости утилизации глюкозы у животных, получавших плацебо, свидетельствуют о развитии инсулинрезистентности или о сниженной секреции инсулина, что указывает на состояние, которое может быть охарактеризовано как преддиабет или скрытая форма СД2 [Решетняк М. В., 2011].

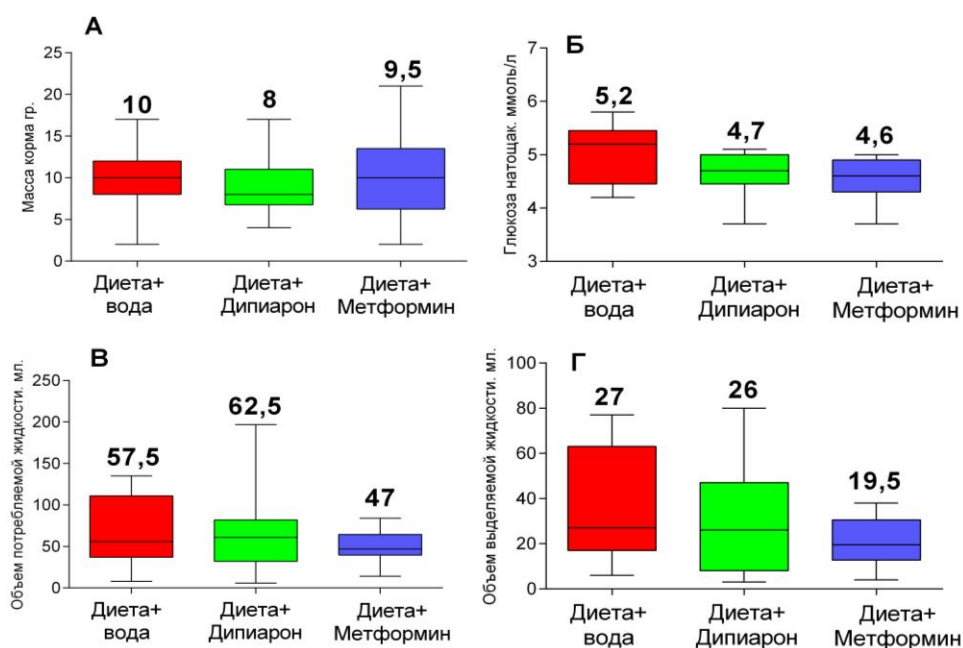


Рис. 7. Вес съеданного корма (А), уровень глюкозы натошак (Б), потребление (В) и выделение (Г) жидкости животными после лечения (обобщенные данные за 3 дня наблюдений)

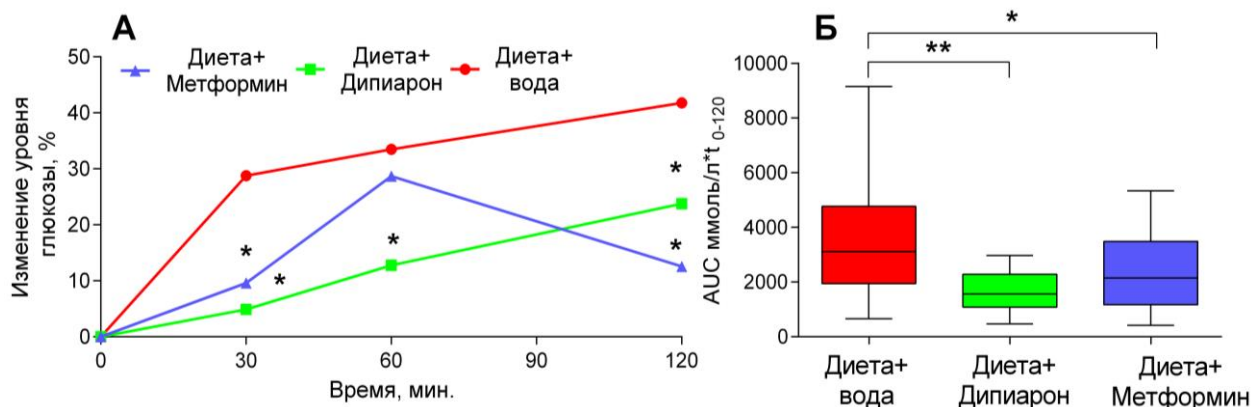


Рис. 8. Динамика гликемии в ходе ПТТГ (в %) (А) и площадь под кривой изменений гликемии в ходе ПТТГ (Б) у животных с ожирением. Примечание: «*» - $p < 0,05$ при сравнении с группой Диета+вода; «**» - $p < 0,01$ при сравнении с той же группой

У крыс, которые в течение 4 недель получали дипиарон, повышение концентрации глюкозы в ходе ПТТГ было значимо ниже, чем в группе, получавшей плацебо. Так, на 30-й минуте теста концентрация глюкозы в крови увеличивалась меньше, чем на 5%, тогда как в контрольной группе – на 28,8%, что может свидетельствовать об отсутствии как нарушений толерантности к глюкозе, так и об инсулинрезистентности. Через 1 час после перорального введения глюкозы у животных, получавших дипиарон, гликемия была только на 12% выше исходной и в 2,5 раза меньше, чем у животных, получавших метформин. Повышенная концентрация глюкозы через 2 часа после ее перорального введения отмечалась у всех животных, но у получавших дипиарон площадь под кривой «концентрация глюкозы-время» была наименьшей (рис.8).

На следующем этапе исследования была оценена способность изолированного и комбинированного введения дипиарона (с метформином или ситаглиптином) препятствовать развитию ожирения, индуцированного диетой у молодых животных. Дизайн исследования представлен в виде схемы (рис.9).

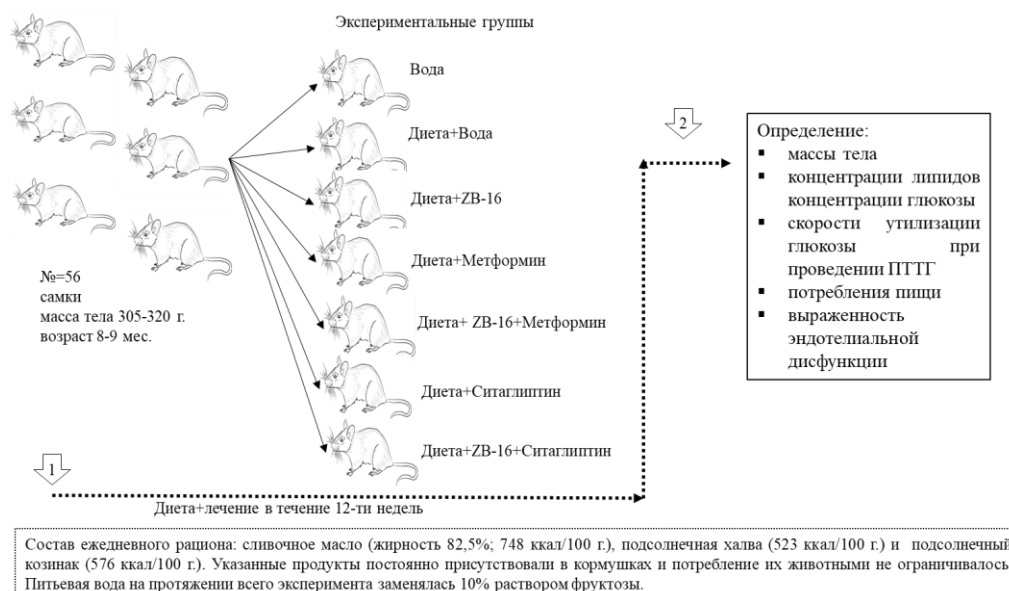


Рис. 9. Дизайн изучения влияния перорального введения дипиарона и метформина на некоторые метаболические показатели животных

После перевода крыс с обычного рациона на высокожировую и высококалорийную диету средняя масса тела животных контрольной группы («Диета+вода») постепенно увеличивалась и через 12 недель была выше начальной на 23% (рис. 2, А), тогда как у животных, получавших комбинированный корм («Интакт») она практически не менялась (+3%). В группах, получавших дипиарон и его комбинацию с ситаглиптином, средняя масса животных увеличилась незначительно (рис. 2, В). Аналогичное введение животным метформина и более выраженно его комбинации с дипиароном вызывало снижение массы тела животных ниже изначальных значений на 3% и 10% соответственно (рис. 2, Б). Курсовое введение ситаглиптина незначительно ограничивало увеличение массы тела животных (за 12 недель +12%), но разница с показателями группы «Диета + вода» не была значимой ($p = 0,9$).

На завершающем этапе исследования у животных всех экспериментальных групп определяли количество потребляемой ими пищи. Через 3 месяца диеты средняя масса съеденного корма (рис.10, Г) была сопоставимой в группах «Интакт» и «Диета+вода», при этом интактные животные имели меньшую массу (более чем на 50 г). Таким образом, пищевое поведение животных с переводом их на другой рацион питания не изменилось, а увеличение массы тела в группе «Диета+вода», очевидно, связано с повышенным содержанием углеводов и жиров в потребляемой пище. В группах, которые получали метформин и ситаглиптин, наблюдалось статистически незначимое снижение количества потребляемой пищи. В то же время животные, которые перорально получали дипиарон, а также его комбинацию с метформином и ситаглиптином, съедали значимо меньшее количество корма, по сравнению с группой «Диета+вода» ($p < 0,05$).

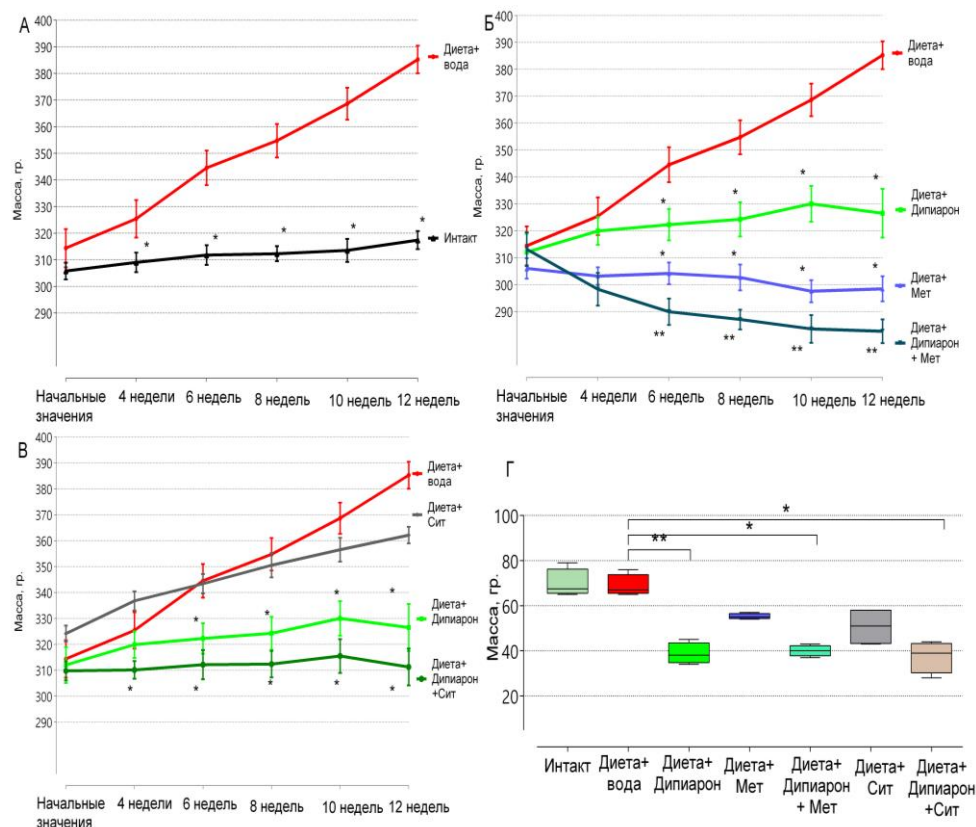


Рис. 10. Масса животных, содержащихся в течение 12 недель на высококалорийной и жировой диете и получавших питьевую воду (А), дипиарон с метформином (Б) или ситаглиптином (В), а также масса съедаемого ими корма (Г). Примечание: *, ** – различия достоверны по отношению к группе «Диета + вода» при $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно

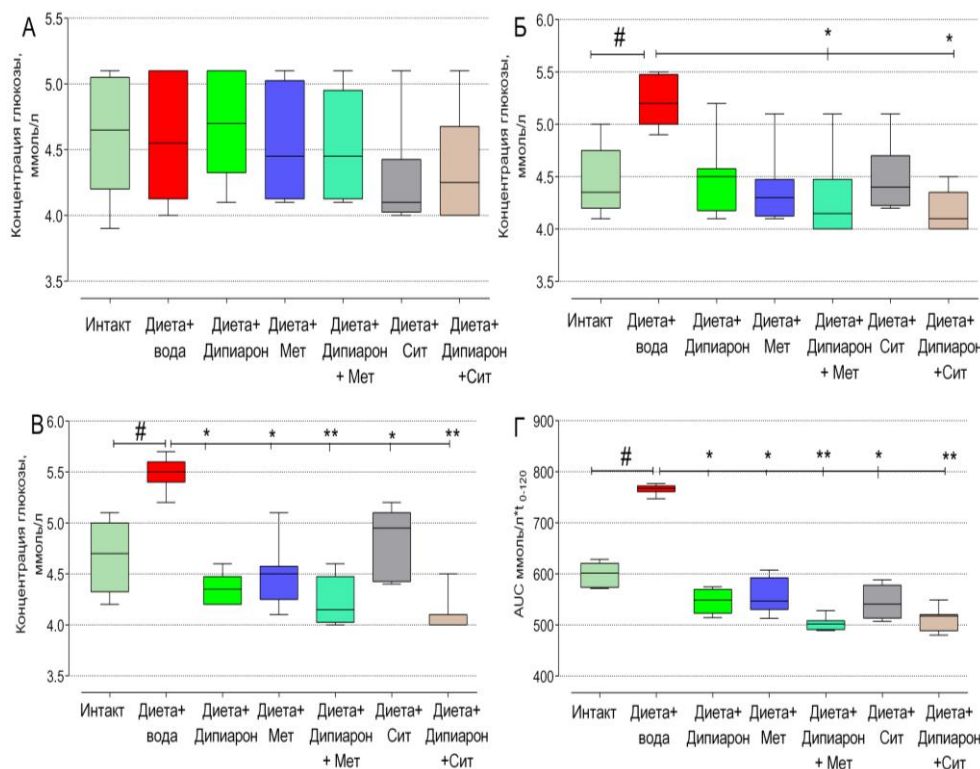


Рис. 11. Уровень гликемии у крыс до (А), через 8 (Б) и 12 (В) недель после высококалорийной и жировой диеты. Площадь под кривой «уровень гликемии-время» через 12 недель после начала диеты (Г). Примечание: *, ** – различия достоверны с группой «Диета+вода» при $p < 0,05$ и $p < 0,01$ # – различия достоверны с группой «Интакт» при $p < 0,05$

Через 8 и 12 недель диеты концентрация глюкозы в крови (измеренной после 6-часового голодания) у животных без «лечения» была значимо выше, чем в интактной (рис. 11 Б, В). В опытных группах через 8 недель диеты и «лечения» значимо низкий уровень гликемии, относительно группы «Диета+вода» ($p < 0,05$), наблюдался у крыс, получавших комбинированную терапию дипиароном с метформином или ситаглиптином (рис. 11 Б). Спустя 12 недель значимо низкий уровень гликемии относительно контроля отмечался в группах, получавших как моно- ($p < 0,05$), так и комбинированную ($p < 0,01$) терапию (Рис. 11, В).

При проведении ПТТГ у животных контрольной группы через 12 недель диеты отмечалось снижение скорости утилизации глюкозы, что выражалось в значимом повышении площади под кривой «уровень гликемии-время» (рис. 11Г). Во всех опытных группах значение площади под кривой было существенно ниже по сравнению с контрольной, но наиболее выраженное в группах, получавших комбинированную терапию ($p < 0,01$) (рис. 11 Г).

Таким образом, курсовое введение агониста GPR119 значительно снижает потребление пищи, а его комбинирование с метформином или ситаглиптином не приводит к более выраженному уменьшению количества потребляемого корма, но вызывает более значимое снижение массы тела и повышение скорости утилизации глюкозы по сравнению с контрольной группой в условиях высококалорийной и жировой диеты.

В контрольной группе через 12 недель после перевода на диету с избыточным содержанием углеводов и жиров средняя масса животных увеличилась на 22,8% и была достоверно выше ($p < 0,05$), по сравнению с интактной. В опытной группе на фоне введения дипиарона прирост массы тела был незначительным (+2,9%), а в группе, получавшей метформин и его комбинацию с дипиароном, масса тела уменьшилась соответственно на 3,3% и 9,7% (рис.12 А).

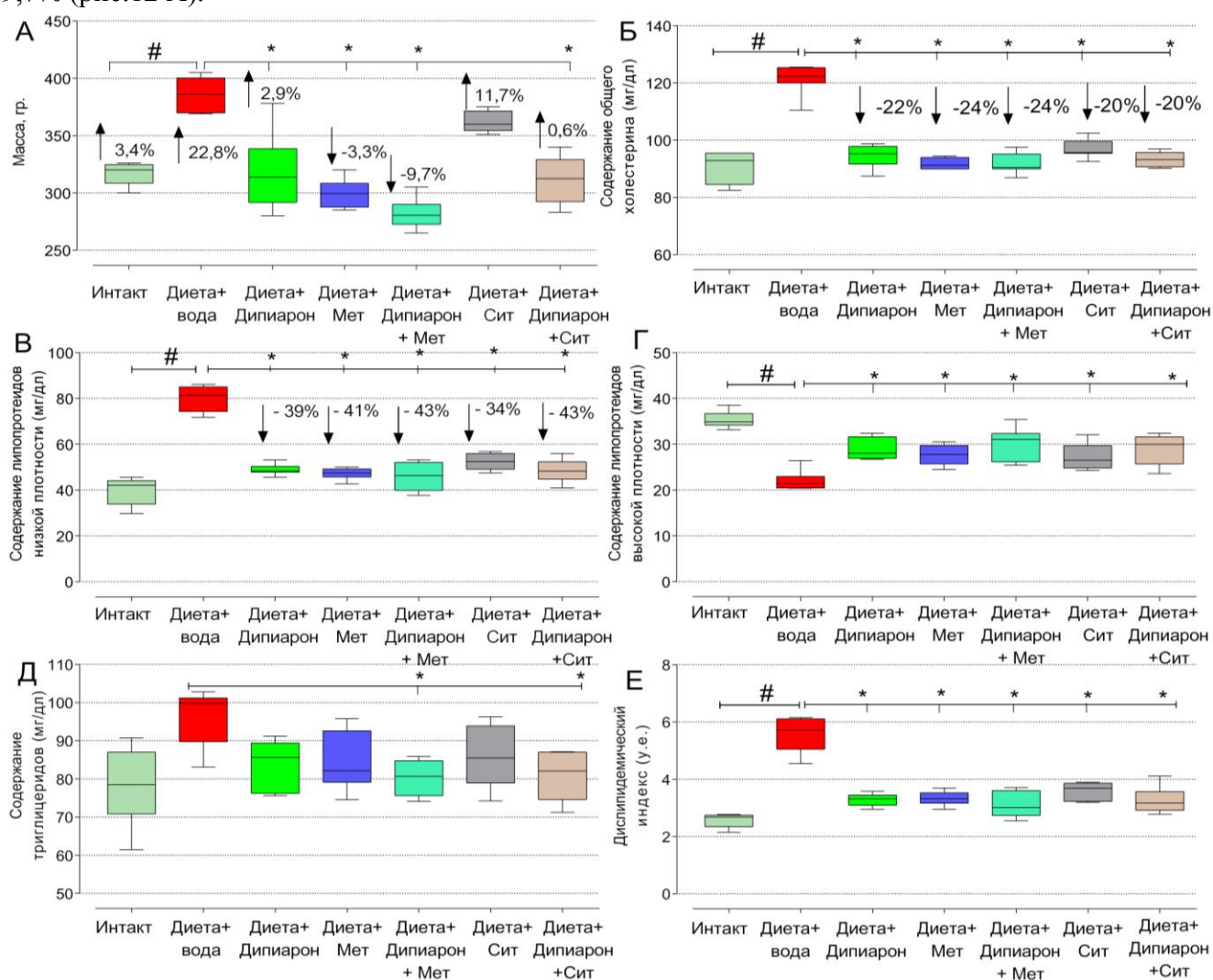
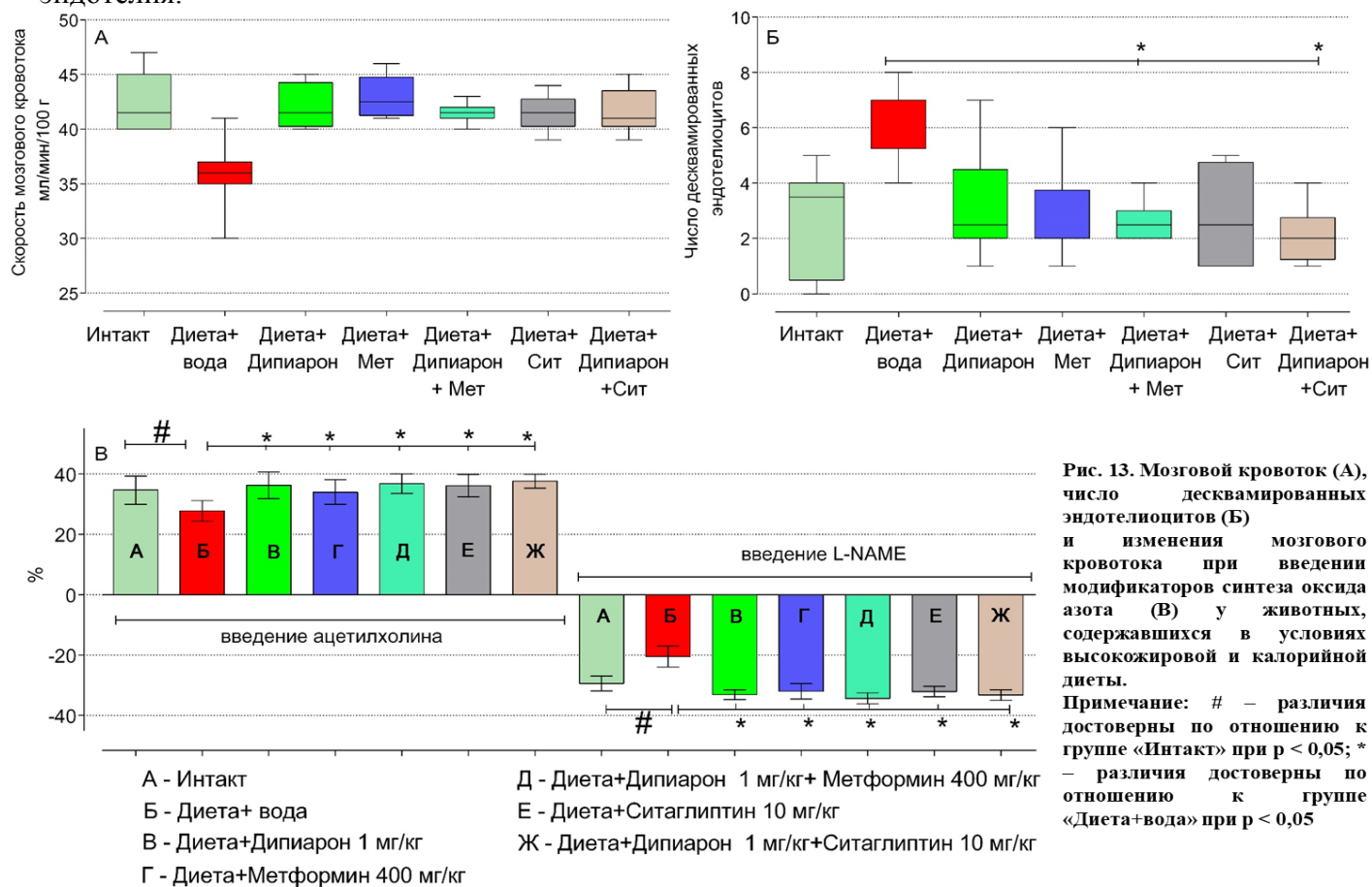


Рис. 12. Масса тела (А), содержание общего холестерина (Б), ЛПНП (В), ЛПВП (Г), триглицеридов (Д) в плазме и дислипидемический индекс (Е) у животных, содержащихся 12 недель в условиях высокожировой и калорийной диеты. Примечание: # – различия достоверны по отношению к группе «Инт.» при $p < 0,05$; * – различия достоверны по отношению к группе «Диета+вода» при $p < 0,05$; стрелками показаны изменения средней массы животных за 12 недель диеты (%)

Через 12 недель после перевода на диету изменения липидного спектра у животных контрольной группы по сравнению с интактной заключались в значимом повышении

содержания общего холестерина и ЛПНП, а также снижении уровня ЛПВП в плазме ($p < 0,05$) (рис. 12 Б, В, Г, Д). У крыс, которым на протяжении 12 недель вводили дипиарон, препараты сравнения и их комбинации, уровень холестерина, триглицеридов, ЛПНП был статистически значимо ниже, а ЛПВП выше, чем в группе негативного контроля ($p < 0,05$) (рис. 12 Б, В, Г, Д). Дислипидемический индекс у животных, получавших «лечение», был также ниже ($p < 0,05$) значений контрольной группы (рис. 12 Е).

У животных контрольной группы через 12 недель диеты мозговой кровоток был ниже ($p = 0,07$), а во всех остальных группах оставался на уровне интактной. Число десквамированных эндотелиоцитов у животных получавших комбинированную терапию значимо ниже ($p < 0,05$) (рис. 13 Б), чем у контрольных. Также в контрольной группе выраженность эндотелийзависимых реакций, отражающих снижение стимулированной (уменьшение реакции на введение ацетилхолина) и базальной (уменьшение реакции на введение L-NAME) продукции оксида азота была ниже чем у интактных животных ($p < 0,05$) (рис. 13 В). При этом, в группах, получавших «лечение», выраженность эндотелийзависимых реакций сосудов головного мозга была сопоставима с интактной группой, что указывает на нормальное функционирование эндотелия.



Таким образом, курсовое введение дипиарона, метформина и более выраженно их комбинация предупреждает увеличение массы тела и развитие нарушений липидного обмена, что, очевидно, связано с характерным для инкретиномиметиков влиянием на аппетит и метаболизм углеводов. Дипиарон и референтные препараты сопоставимо влияют на функциональное состояние эндотелия у животных, содержащихся в условиях высокожировой и калорийной диеты.

В шестой главе представлены результаты изучения механизма действия дипиарона.

Исходя из структуры соединения и данных, полученных *in vitro* на этапе первичного скрининга агонистов GPR119, мы предположили, что пероральное введение дипиарона будет стимулировать секрецию инкретинов и инсулина, а также снижать концентрацию глюкагона в плазме крови. Изучение влияния перорального введения соединения ZB-16 на концентрацию ГПП-1, инсулина, глюкагона и глюкозы было выполнено на интактных и животных с ЭСД.

Начальный уровень ГПП-1 у животных с экспериментальным СД был ниже, чем у интактных и на 121% ($p < 0,001$) ниже, чем у тех, которым 28 дней перорально давали дипиарон (рис.15 A1, A2). Пероральное введение дипиарона за 30 минут до измерения концентрации ГПП-1 приводило к увеличению содержания этого гормона на 119% ($p < 0,001$). Таким образом, пероральное введение соединения ZB-16 вне зависимости от наличия или отсутствия СД повышает секрецию ГПП-1 в плазме животных.

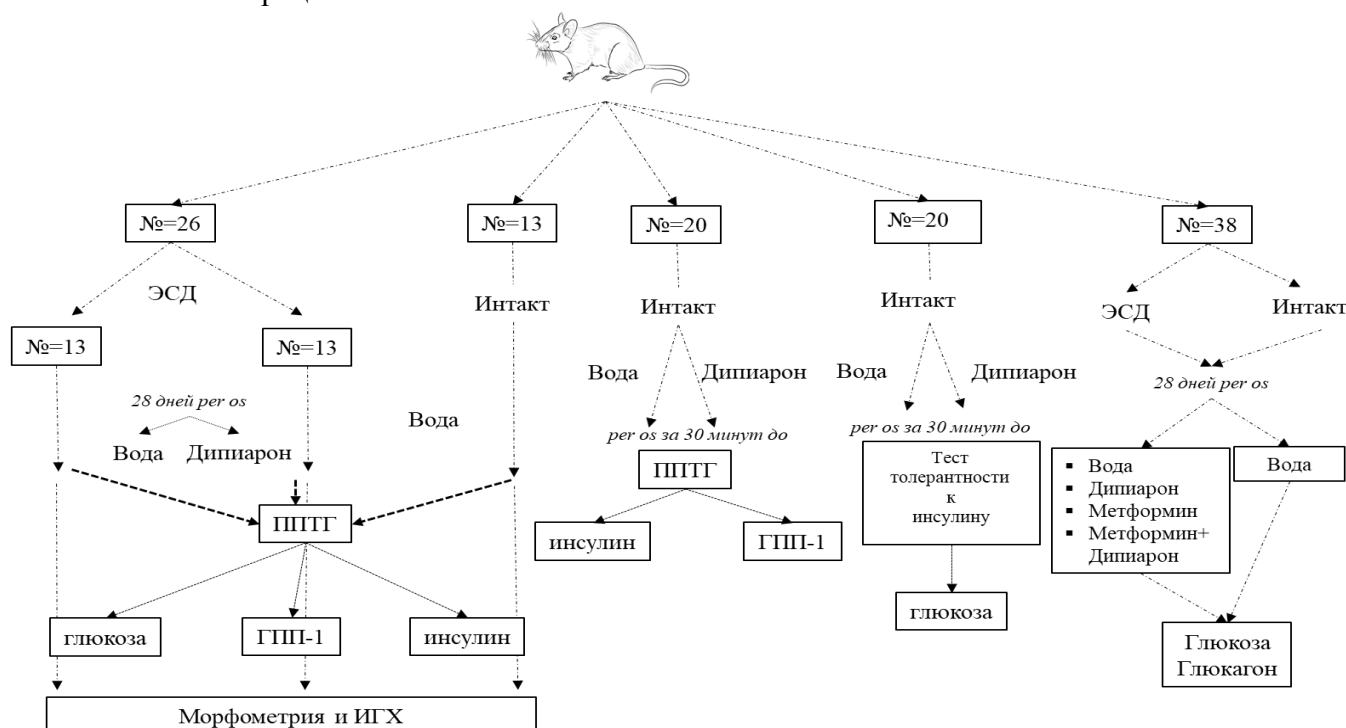


Рис. 14. Дизайн исследования влияния перорального введения соединения ZB-16 на секрецию ГПП-1, глюкозы и инсулина

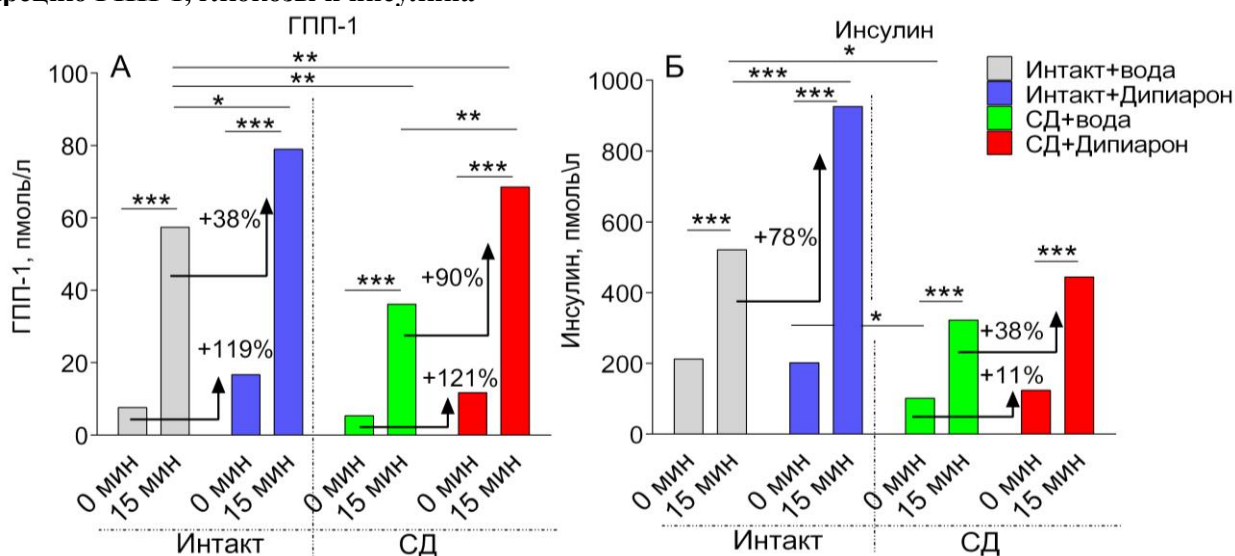


Рис. 15. Влияние дипиарона на концентрации ГПП-1 (А1, А2), инсулина (Б1, Б2) при пероральном введении интактным и животным с ЭСД при проведении ПТТГ. Примечание: различия достоверны, критерий Ньюмена Кейлса: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

Начальные концентрации инсулина в крови интактных животных были практически одинаковыми (рис.15 Б1, Б2). При измерении концентрации ГПП-1 через 15 минут после пероральной глюкозной нагрузки было обнаружено, что у интактных животных концентрация инкретина увеличилась на 38% ($p < 0,01$) а инсулина на 78% ($p < 0,01$) больше, чем у животных, получивших плацебо. Аналогичное измерение у животных с ЭСД показало, что у тех, которым давали плацебо, секреция ГПП-1 была меньше, чем у интактных, но введение дипиарона повышало его концентрацию, и, в итоге, этот показатель отличался от группы плацебо более,

чем на 90%. Секретия ГПП-1 на фоне предварительно введенного дипиарона у животных с ЭСД была выше, чем в интактной группе. Начальная концентрация инсулина у животных с ЭСД до пероральной нагрузки глюкозой была на 11% ниже чем у получавших дипиарон, а через 15 минут после глюкозной нагрузки концентрация инсулина в крови животных получавших дипиарон увеличилась на 38% ($p < 0,01$) больше чем в контрольной группе (рис.15 Б1).

Разница в концентрации инсулина между животными обеих интактных групп составила 78% ($p < 0,01$). Стимулированная секретия инсулина у животных, которым моделировали ЭСД и 28 дней вводили дипиарон, была сопоставима со значениями интактной группы животных, которые получали плацебо.

В ходе исследования не было обнаружено значимых различий между уровнями ГПП-1 и инсулина через 15 минут после введения глюкозы между животными с ЭСД, которые получали дипиарон, и интактными. Начальное значение концентрации глюкозы у животных, терапевтически получавших дипиарон, было ниже, чем у тех, которым вводили плацебо, но значительно выше, чем у интактных. В то же время при измерении этого показателя через 15 минут после нагрузки глюкозой её уровень в крови возрастал менее значительно, чем в группе плацебо. Изначально высокая концентрация глюкозы и выраженная (сопоставимая с уровнем интактных животных) секретия инсулина в группе получавшей дипиарон может свидетельствовать о том, что его введение, влияет на секретцию инсулина, но не на его синтез. Можно предположить, что это приводит к значительному постпрандиальному увеличению его концентрации, но к недостаточной его продукции в отсроченные периоды, что подтверждается повышенным уровнем глюкозы в крови животных с ЭСД и получавших дипиарон.

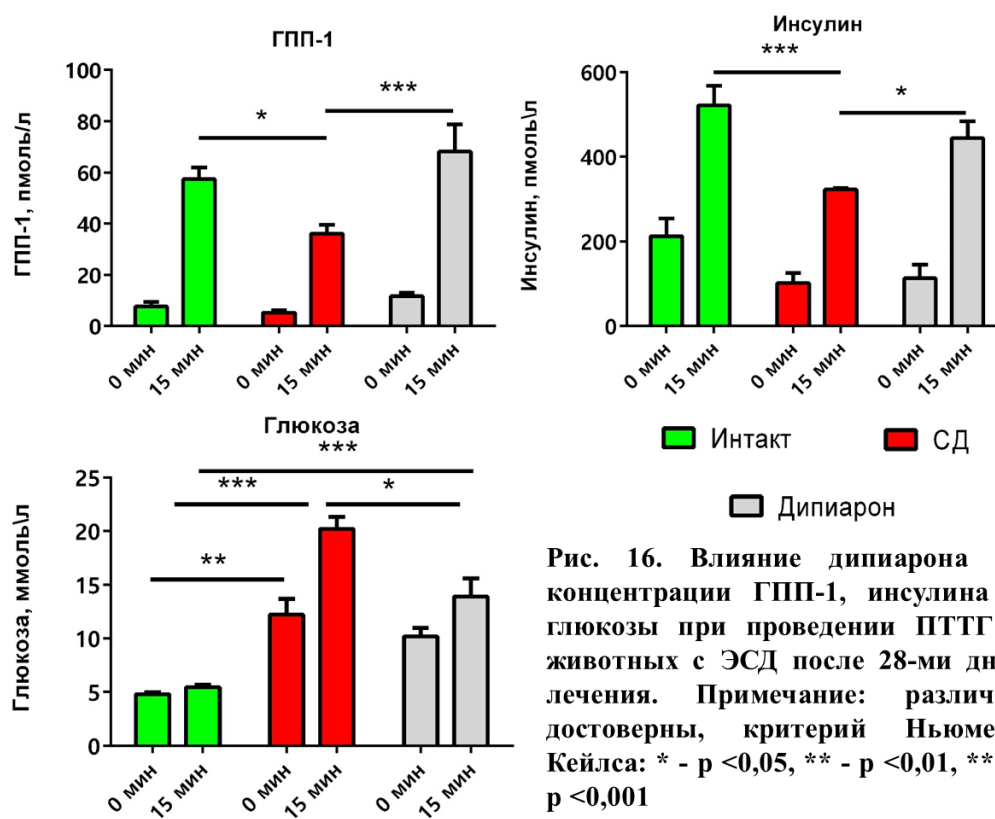


Рис. 16. Влияние дипиарона на концентрации ГПП-1, инсулина и глюкозы при проведении ПТТГ у животных с ЭСД после 28-ми дней лечения. Примечание: различия достоверны, критерий Ньюмена Кейлса: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

У животных, которым смоделировали ЭСД и затем в течение 28 дней перорально вводили дипиарон и его комбинацию с метформином, концентрации глюкагона были минимальными (рис.17), что, очевидно, связано со способностью ГПП-1 подавлять его секретцию α -клетками поджелудочной железы. При этом концентрация глюкагона в этих группах была сопоставима между собой, что показывает ведущую роль дипиарона на этот показатель, а также достижение предела эффективности или невозможности дальнейшего снижения концентрации глюкагона в крови экспериментальных животных.

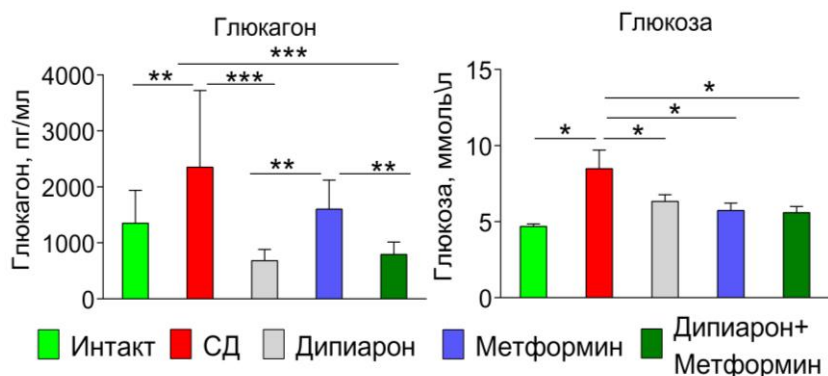


Рис. 17. Влияние дипиарона и его комбинации с метформином на концентрацию глюкагона и глюкозы у животных с ЭСД после 28 дней лечения. Примечание: различия достоверны критерий Ньюмена Кейлса: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

Учитывая увеличение концентрации инсулина и снижение глюкагона под действием дипиарона, мы предположили, что его пероральное введение может пролонгировать действие инсулина. Как отмечалось выше, секреция инсулина под действием дипиарона имеет глюкозозависимый характер, однако его влияние на действие эндогенного инсулина имеет важное клиническое значение, что и послужило поводом для проведения экспериментального исследования.

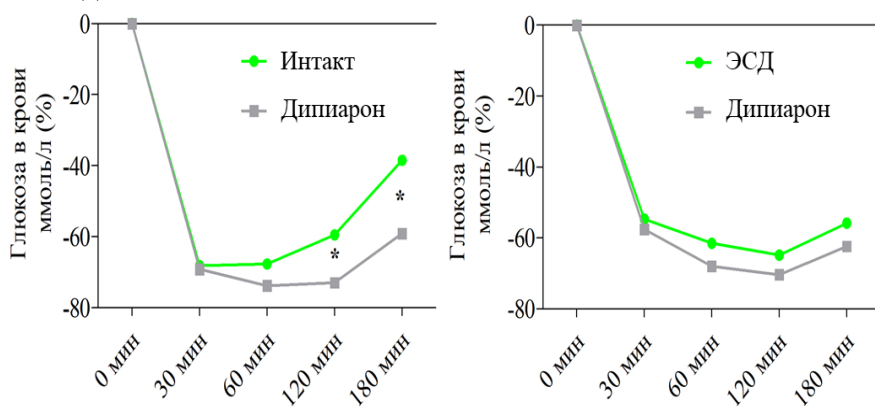


Рис. 18. Динамика уровня гликемии (%) при проведении инсулинового теста толерантности (ИТТ) на интактных (А) и животных с ЭСД (Б). Примечание: * – достоверно по отношению к группе Интакт ($p < 0,05$)

После введения инсулина интактным животным в контрольной группе наблюдалось повышение уровня гликемии с 60 по 180 минуту, а в опытной группе на 120 и 180 минутах теста наблюдался значимо меньший уровень гликемии (рис.18А). Таким образом, дипиарон пролонгирует действие инсулина, что может быть связано с увеличением его секреции или чувствительности тканей.

На животных с ЭСД гипогликемический эффект тех же доз инсулина (30 минут) выражен меньше, чем у животных без ЭСД (рис.18 Б). У животных в течение 4 недель, получавших дипиарон, эффекты экзогенного инсулина были более выраженными по сравнению с контрольной группой.

Результаты морфометрического анализа ткани поджелудочной железы животных с ЭСД и получавших дипиарон в дозах 0.1 и 1 мг/кг (рис. 19, 20), показывают, что размер и площадь β -клеток у животных контрольной группы была ниже чем в интактной. Курсовое терапевтическое применение дипиарона оказывает панкреопротекторное действие, повышая пролиферацию и подавляя апоптоз в инсулинположительных эндокринных клетках, следствием чего, очевидно, является более интенсивное восстановление ткани железы.

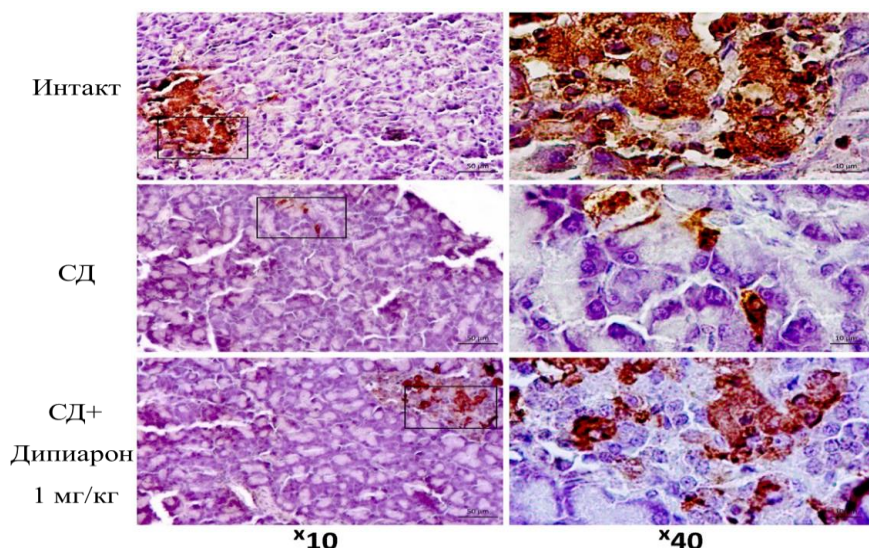


Рис. 19. Типичные морфологические изменения в островках поджелудочной железы, окрашенных мышиными моноклональными антителами к инсулину с диаминобензидином в качестве хромогенного субстрата и дополнительной окраской с помощью гематоксилина, в увеличении $\times 10$ и $\times 40$

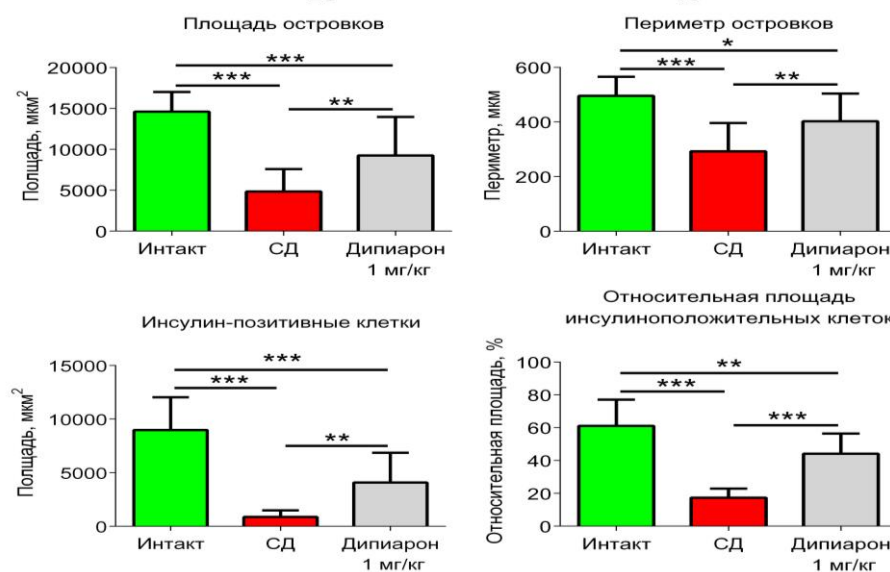


Рис. 20. Обобщенные морфометрические данные изменений в островках поджелудочной железы

В настоящем исследовании показано, что терапевтическое пероральное курсовое введение дипиарона повышает секрецию ГПП-1 и инсулина, проявляет выраженное гипогликемическое действие и подавляет секрецию глюкагона, а также оказывает защитное и/или репаративное действие на β -клетки поджелудочной железы крыс с ЭСД. Все это подтверждает, что дипиарон оказывает комплексное противодиабетическое действие, а спектр его эффектов в большей степени соответствует описываемым для инкретинов, что, учитывая его агонистическую активность в отношении рецептора, позволяет, с одной стороны, подтвердить участие GPR119 в регуляции секреции инкретинов, а с другой – доказать инкретинмиметический механизм действия нового агониста.

В **седьмой главе** было изучено церебропротективное действие дипиарона и его комбинаций с церебропротективным и гипогликемическими препаратами при острых и хронических НМК, воспроизведенных на фоне ЭСД (рис. 21).

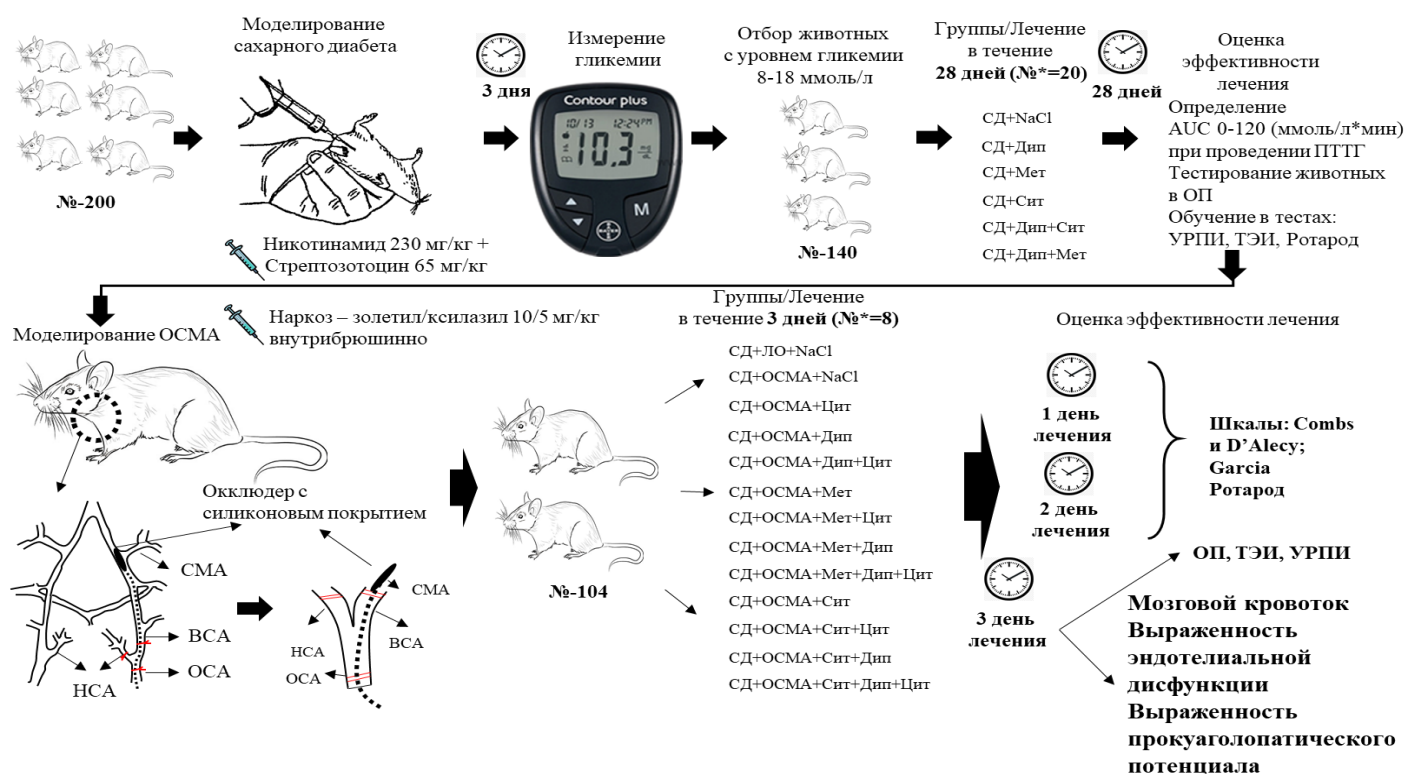
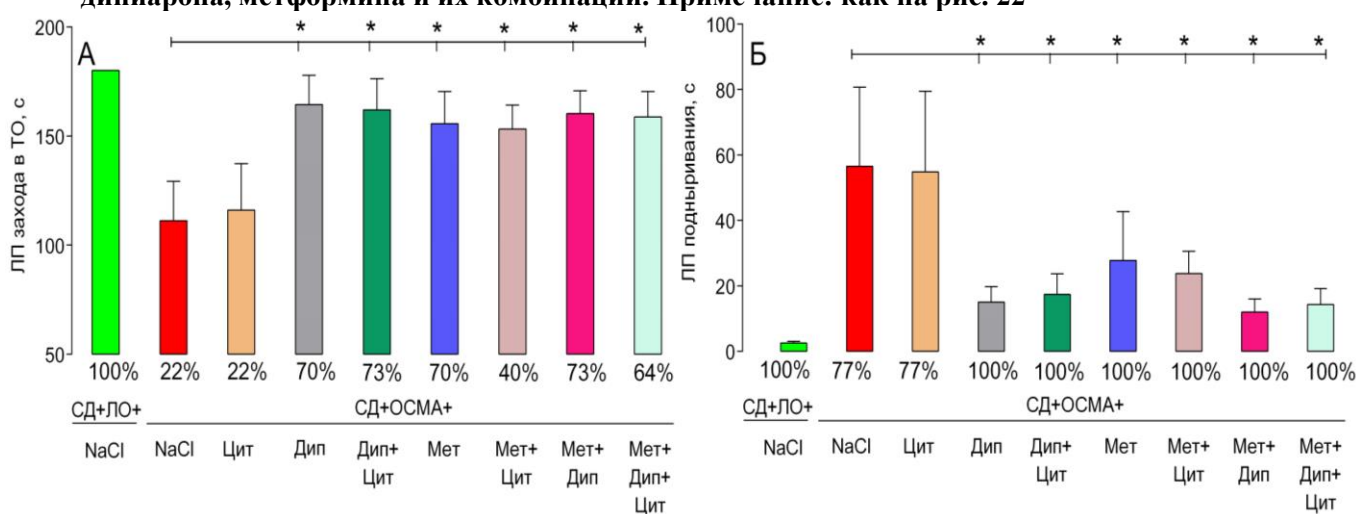
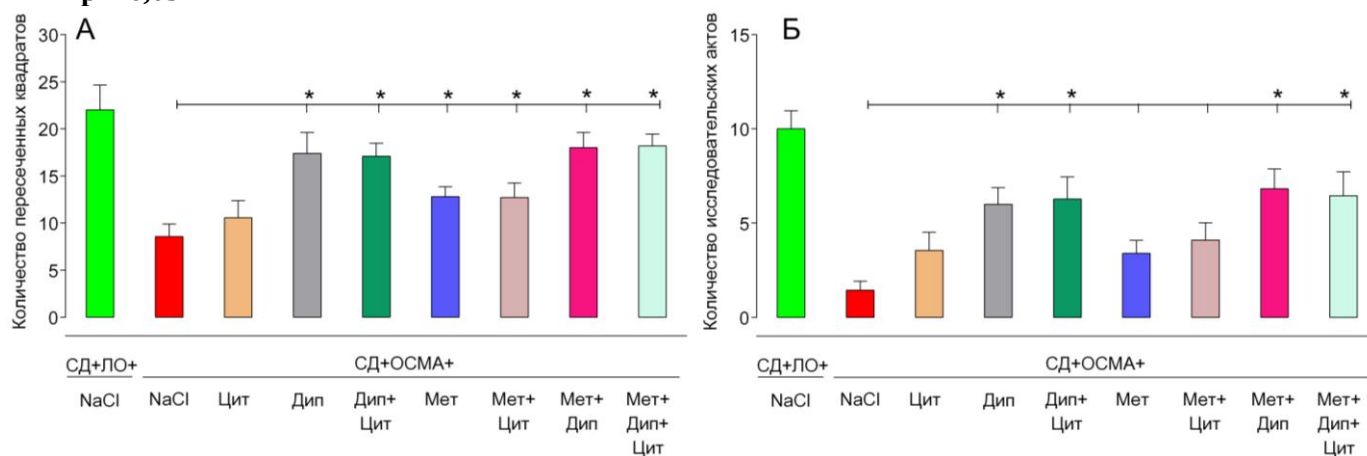
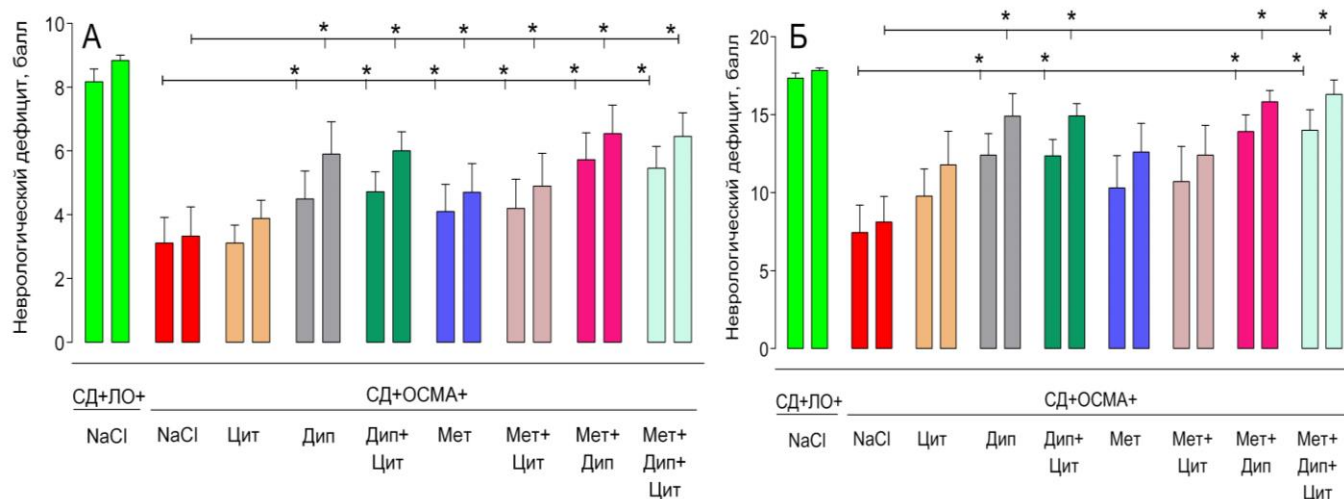


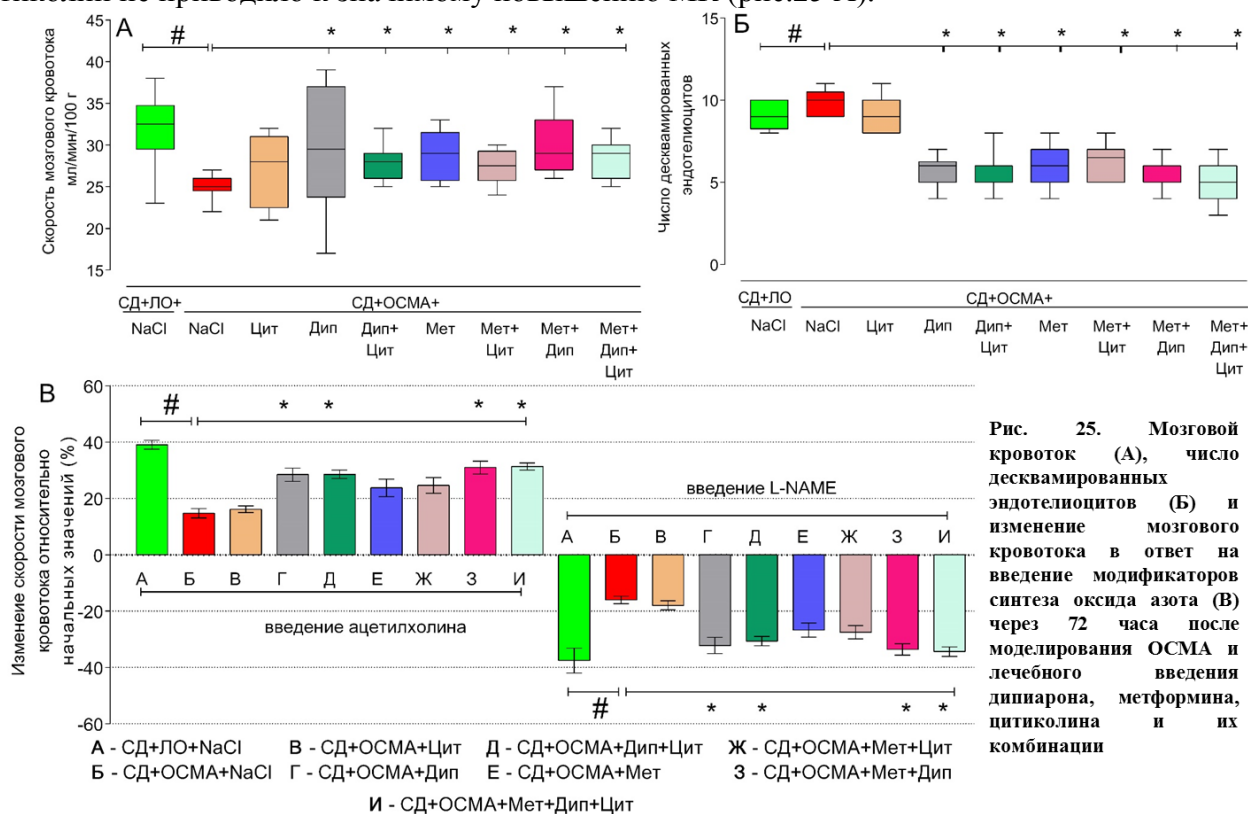
Рис. 21. Дизайн исследования церебропротекторного действия дипиарона на модели ОСМА воспроизведенной на фоне ЭСД. Примечание: СД – сахарный диабет; ОП – открытое поле; УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания; ТЭИ – тест экстраполяционного избегания; ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии; НСА – наружная сонная артерия; СМА – средняя мозговая артерия; ВСА – внутренняя сонная артерия; ОСА – общая сонная артерия; NaCl – физиологический раствор; ЛО – ложная операция; Дип – агонист GPR119; Дип – дипиарон; Цит – цитиколин; Мет – метформин; № – общее число животных; №* – число животных в группе; интактная группа составляла 10 животных

У животных, которым терапевтически вводили дипиарон, метформин и более выраженно их комбинацию, симптомы неврологического дефицита были менее тяжелыми ($5,7 \pm 0,8$ балла по шкале Combs и D'Alecy; $13,9 \pm 1,1$ балла по шкале Garcia; $p < 0,05$), а регресс симптомов психоневрологического дефицита (через 48 часов после операции баллы составили $6,5 \pm 0,9$ и $15,8 \pm 0,7$ соответственно; $p < 0,05$) проходил лучше, чем у получавших плацебо или цитиколин (рис. 22). Комбинированное введение дипиарона с цитиколином и метформина с цитиколином приводило к усилению церебропротективного эффекта и эти животные дольше других держались на вращающемся стержне, а показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности были статистически значимо выше, чем в группе негативного контроля. Добавление к терапии дипиароном и метформином цитиколина не повлияло на показатели активности животных в «ОП» (рис. 23).



Латентный период захода в темный отсек установки УРПИ у животных, получавших дипиарон или его комбинации, был выше, а время решения экстраполяционной задачи в ТЭИ меньше, чем у контрольных, что свидетельствует о меньшем повреждении мнестической функции. Также животных, не зашедших в темный отсек УРПИ и решивших экстраполяционную задачу в ТЭИ было больше в группах, получавших дипиарон и особенно его комбинации.

Мозговой кровоток (МК), регистрируемый в проекции средней мозговой артерии у животных, перенесших ОСМА, был ниже, чем у ЛО (группа СД+ЛО+NaCl). Минимальные значения МК регистрировались в группах, получавших физиологический раствор или цитиколин. У животных, которым после моделирования ОСМА перорально вводили дипиарон, метформин или их комбинацию, значения МК были достоверно выше, чем в группе, получавшей физиологический раствор. Добавление к терапии церебропротекторного препарата цитиколин не приводило к значимому повышению МК (рис.25 А).



У животных, которым вводили дипиарон, метформин и их комбинацию, с цитиколином или без, число десквамированных эндотелиоцитов также было достоверно меньше (рис. 25 Б). При оценке функциональной активности эндотелия, а именно стимулированной (ацетилхолином) и базальной (при введении L-NAME) секреции NO, в группе ЛО животных отмечались максимально выраженные сосудистые реакции в ответ на стимулирование и блокаду eNOS, что обеспечивает более высокий мозговой кровоток и свидетельствует о меньшей выраженности эндотелиальной дисфункции. Сосудистые реакции животных, которые получали дипиарон, его комбинации с метформином и/или цитиколином, были выражены сильнее, чем в контрольной и группах, получавших метформин и его комбинацию с цитиколином (рис 25 В).

При СД и ишемии ГМ наблюдается активация ПОЛ, что является одной из причин нейродегенерации и снижения когнитивной функции. Концентрация продуктов, реагирующих с ТБК была выше у животных, которым моделировали СД без последующей ОСМА (группа СД+ЛО+NaCl) или с ней (группа СД+ОСМА+NaCl, СД+ОСМА+Цит) и которые не получали гипогликемическую терапию. В тех группах, которые получали дипиарон, его комбинацию с метформином или цитиколином, но не метформин в отдельности, концентрация ТБК-активных продуктов была достоверно ниже, чем в контрольной группе (рис.26 А).

Косвенным проявлением оксидативного стресса и его повреждающего действия на клеточные мембраны является снижение времени кислотного гемолиза эритроцитов. При его изучении наиболее выраженные изменения были отмечены у животных, перенесших ОСМА на фоне СД, гемолиз эритроцитов у них происходил в максимально короткие сроки, тогда как у животных, получавших дипиарон или его комбинацию с цитиколином и/или метформином период гемолиза был более продолжительным (рис.26 Б).

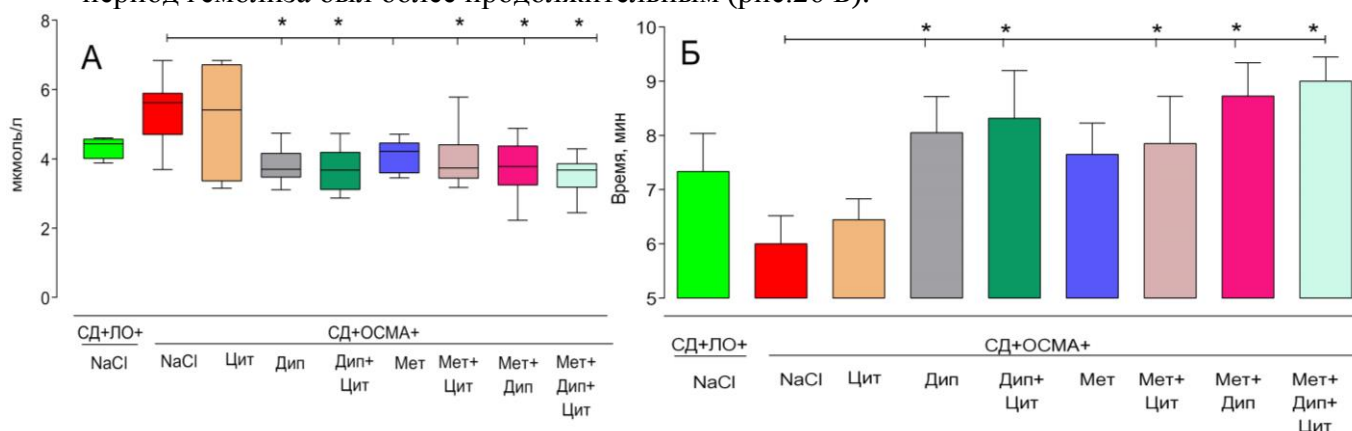
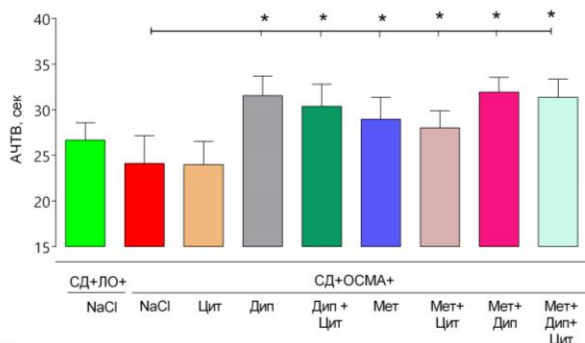


Рис. 26. Концентрация продуктов, прореагировавших с ТБК (А) и продолжительность кислотного гемолиза эритроцитов (Б) у животных после моделирования ОСМА и лечебного введения дипиарона, метформина, цитиколина и их комбинации. Примечание: как на рис. 22.

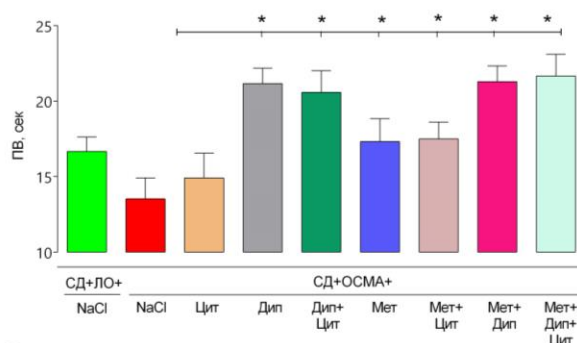
У экспериментальных животных с воспроизведенной на фоне СД и ОСМА отмечались выраженные нарушения плазменного гемостаза. Так, у животных негативной контрольной группы и тех, которым вводили цитиколин, и группы ЛО животных (с СД, но без ишемии) было отмечено укорочение длительности АЧТВ, ПВ и ТВ, а также более высокая концентрация фибриногена. В то же время у получавших дипиарон, метформин (менее выраженно) и их комбинацию (более выраженно), указанные выше показатели плазменного гемостаза достоверно отличались от таковых в группах, не получавших предшествующей ОСМА гипогликемической терапии (рис.27).

Повышение коагулопатического потенциала является одной из основных причин развития первой и повторной cerebrovascularной катастрофы, а также фактором, в значительной степени осложняющим реабилитацию пациента. Сахарный диабет значительно отягощает течение экспериментальной фокальной ишемии головного мозга [Бакулин Д.А., 2016], увеличивая гибель экспериментальных животных по сравнению с моделированием аналогичной патологии у интактных животных сопоставимого пола, веса и возраста. Причиной, отягощающей течение ОСМА на фоне СД, может быть образование большего, чем у интактных животных тромба, вызывающего ОСМА, а соответственно изначально большей ядерной зоны некроза и более быстрого ее распространения. В настоящем исследовании показано, что у животных, которые не получали предшествующей ОСМА гипогликемической терапии, тяжесть эндотелиальной дисфункции, выраженность оксидативного стресса, повреждение клеточных мембран и нарушения плазменного гемостаза были более выраженными, что, очевидно, является причиной сравнительно более тяжелого течения ОСМА и большей зоны некроза мозговой ткани (рис.28).

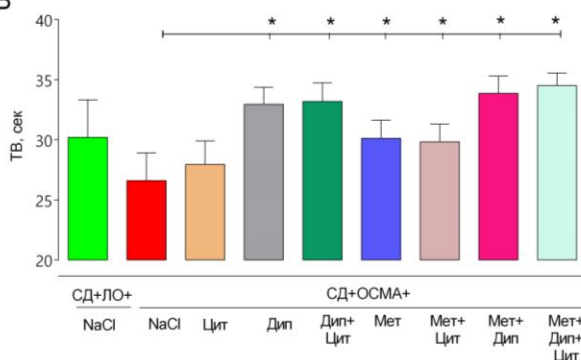
А



Б



В



Г

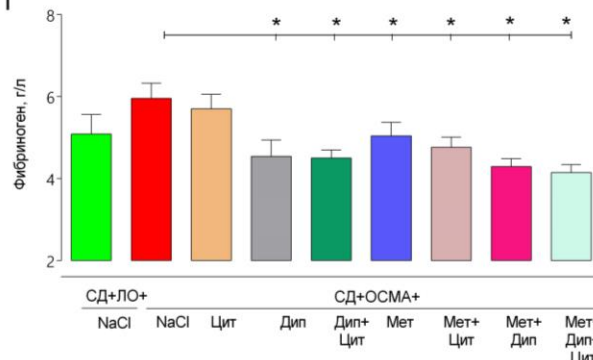


Рис. 27. Влияние лечебного введения дипиарона, метформина, цитиколина и их комбинации на длительность АЧТВ (А), ПВ (Б), ТВ (В) и концентрация фибриногена (Г) у животных с СД и после моделирования ОСМА. Примечание: как на рис. 22

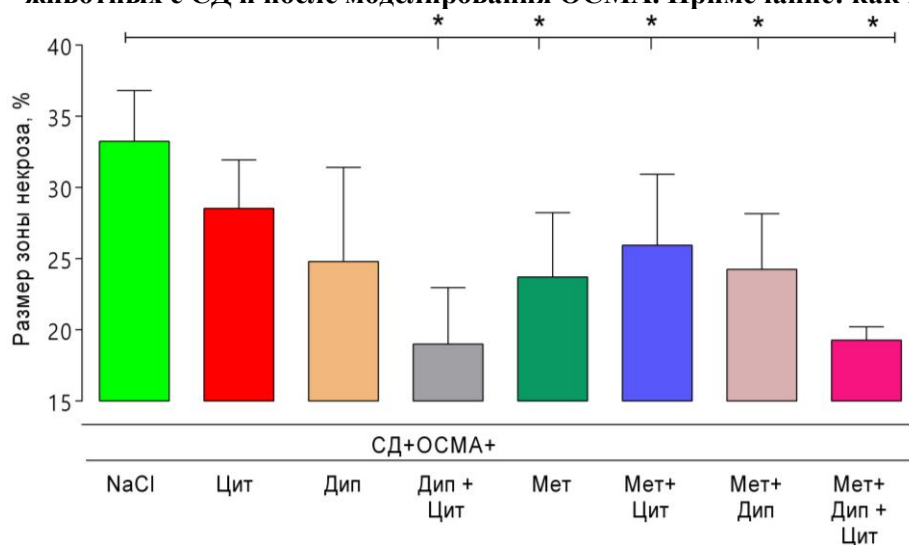


Рис. 28. Влияние лечебного введения дипиарона, метформина, цитиколина и их комбинации на размер зоны некроза мозговой ткани у животных через 72 часа после моделирования ОСМА. Примечание: как на рис. 22

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что меньшие, чем в группе ЛО животных, значения скорости мозгового кровотока после 30-минутной ОСМА могут быть частично объяснены более интенсивным протеканием процессов постреперфузионного тромбообразования, о чем косвенно свидетельствуют отмеченные нарушения плазменного гемостаза и большие размеры зоны некроза мозговой ткани. Сниженная реакция эндотелия на активацию eNOS ацетилхолином свидетельствует о низкой стимулированной секреции NO, как основного вазодилатирующего фактора, а меньший вазоконстрикторный эффект L-NAME – о сниженной его базальной продукции. Оксидативный стресс и низкая устойчивость клеточных мембран к кислотному гемолизу также, очевидно, являются, с одной стороны, маркерами эндотелиальной дисфункции, с другой – ее причиной и следствием. В результате проведенного исследования отмечено, что проявления эндотелиальной дисфункции, оксидативного стресса, состояния клеточных мембран, нарушения плазменного гемостаза и, в конечном итоге, размер зоны некроза мозговой ткани были более выраженными у животных, которые не получали

предшествующей ОСМА гипогликемической терапии. Пероральное введение дипиарона, метформина и в большей степени их комбинации в значительной степени снижало тяжесть нарушений углеводного обмена. Проявления эндотелиальной дисфункции, оксидативного стресса, нарушений в плазменном гемостазе и повреждение клеточных мембран, а также зона некроза мозговой ткани после ОСМА были меньше. Дополнительное после моделирования ОСМА введение цитиколина практически не повышало эффективность проводимой ранее гипогликемической терапии. Представленное выше доказывает наличие плеiotропных эффектов, свойственных препаратам, влияющим на инкретиновую систему, среди которых имеет место выраженное церебро- и эндотелиопротективное действие.

Таким образом дипиарон обладает не только гипогликемическим действием, сопоставимым с таковым у метформина, но и оказывает более выраженное, церебро- и эндотелиопротективное действие, усиливающееся при их комбинированном введении.

Учитывая длительный период бессимптомного течения СД и параллельных с ним процессов, обуславливающих возникновение эндотелиальной дисфункции, развитие микро- и макроангиопатий, представлялось целесообразным оценить церебропротективное действие дипиарона в условиях хронического нарушения мозгового кровообращения (ХНМК) и СД.

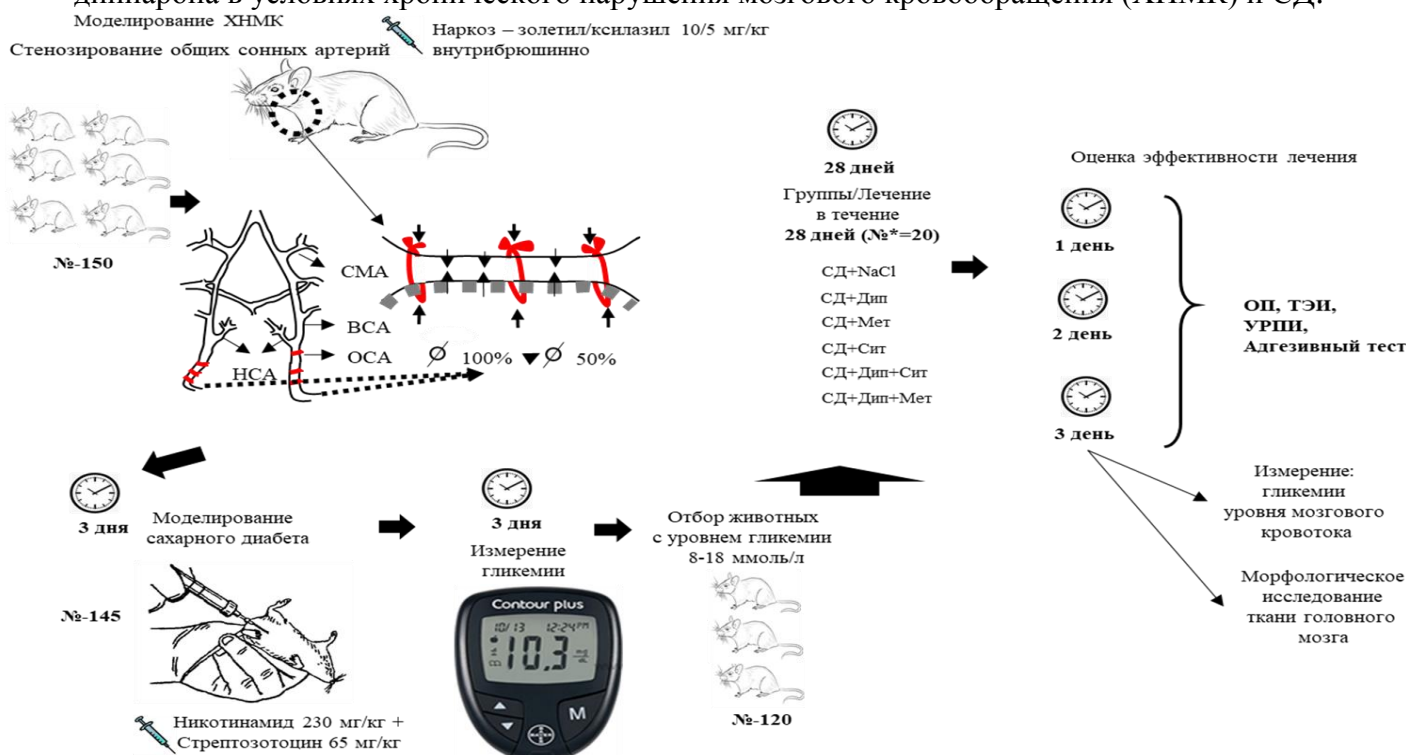


Рис. 29. Дизайн исследования церебропротективного действия дипиарона на модели ХНМК, воспроизведенной на фоне ЭСД

У экспериментальных животных путем стенозирования общих сонных артерий воспроизводилось ХНМК, а через 5 дней экспериментальный СД, и после контрольного измерения (на третий день) уровня гликемии животные распределялись на группы в зависимости от терапии (рис. 29).

На 28-й день «терапии» животные тестировались в ОП, по результатам которого двигательная и ориентировочно-исследовательская активности крыс с ХНМК были на 40% и 52% ниже, чем в интактной группе, а у тех, которым моделировали только СД, на 35% и 39%. Ограничение мозгового кровотока и хроническая гипергликемия прогнозируемо оказывает большее повреждающее действие, чем эти патологические факторы по отдельности. У животных с комбинированной патологией показатели, отражающие число совершаемых ими двигательных и исследовательских актов, были ниже на 60% и 72%, чем у интактных, на 34% и 42% ниже, чем у стенозированных, и на 39% и 55% ниже, чем в группе с ЭСД.

ХНМК и гипергликемия приводили к различным нарушениям памяти у экспериментальных животных. Так, стенозирование общих сонных артерий привело к тому, что

45% экспериментальных животных забыли об электроболевым раздражении, полученном в установке УРПИ, и зашли в него при повторном тестировании, ЛП захода был ниже, чем при воспроизведении на следующий день после обучения, что свидетельствует о нарушении процесса формирования памяти. Время решения экстраполяционной задачи этими животными по сравнению с аналогичным показателем в интактной группе было больше на 206% и 19%, чем зафиксированное при воспроизведении на следующий день после обучения. Длительная гипергликемия в меньшей степени, чем стеноз, но приводила к нарушению памяти экспериментальных животных. Так, 40% крыс с 28-дневной гипергликемией и не получавших «лечение», зашли в темный отсек установки УРПИ, причем сделали это на 21% быстрее, чем при тестировании на следующий день после обучения. Также животные этой группы на 17% и 109% медленнее решали экстраполяционную задачу, чем в первый раз после обучения и чем животные интактной группы соответственно.

ХНМК у животных с ЭСД более значимо, чем эти патологии по отдельности оказывало повреждающее действие в отношении ЦНС животных. Так, 56% животных зашли в темный отсек УРПИ, при этом они сделали это на 28%, 50%, быстрее, чем при первом воспроизведении, и на 35% и 24% быстрее, чем животные интактной, группы с экспериментальным СД или стенозом. Также эти животные на 42%, 483% медленнее, чем при первом воспроизведении, и на 183% и 90% медленнее, чем животные интактной, группы с экспериментальным СД или стенозом, решали экстраполяционную задачу в ТЭИ. Курсовое пероральное введение экспериментальным животным с ХНМК и СД метформина и ситаглиптина не оказывало значимое влияние на показатели их когнитивной функции.

Пероральное введение дипиарона, но более выражено его комбинации с метформином или ситаглиптином, оказывало церебропротективное действие. У животных, которым вводили только дипиарон, латентный период захода в темный отсек был только на 11% меньше, чем при первом воспроизведении, и на 44% больше группы, не получавшей «лечение», при этом только 33% животных группы забыли об электро-болевым раздражении. Животные этой группы на 17% и 57% быстрее чем в первый раз, и контрольная группа соответственно решали экстраполяционную задачу. Пероральное введение дипиарона в комбинации с метформином или ситаглиптином привело к тому, что только 22% и 25% животных этих групп зашли в темный отсек установки УРПИ, при этом сделали это всего на 9% и 6% быстрее, чем при первом воспроизведении навыка, но на 74% и 68% медленнее животных контрольной группы. Также животные этих групп на 35% и 215 быстрее, чем при первом воспроизведении, решали экстраполяционную задачу, и на 69% и 52% быстрее контрольных.

При СД и ХНМК отмечаются нарушения сенсомоторной функции. При проведении адгезивного теста было отмечено увеличение времени обнаружения и удаления инородного предмета, закрепленного на волярной поверхности передних лап по сравнению с животными интактной группы, у которых эти показатели практически не изменились спустя 14 дней. У животных, которым моделировали СД, стеноз общих сонных артерий или комбинацию этих патологий, отмечались сенсомоторные нарушения, которые со временем прогрессировали. Так, они дольше не обращали внимания и не удаляли инородный предмет, закрепленный на лапе, при этом различия были достоверными не только с группой интактных животных, но и по сравнению с результатами, полученными двумя неделями ранее. Животные, которым был смоделирован только ЭСД, обнаруживали инородный предмет на лапках в среднем за $62,8 \pm 15,3$ с; $65,1 \pm 15,2$ с и удаляли его за $100,3 \pm 23,3$ с; $101,3 \pm 19,1$ с (для левой и правой лап соответственно), что было на 94% и 60%; 78% и 59% дольше, чем у интактных, и на 21% и 25%; 7% и 12% дольше по сравнению с результатами, полученными от этих животных на 14 день. У животных, которым был смоделирован стеноз, на 28 день при проведении адгезивного теста было отмечено, что они обнаруживали и удаляли пластырь в среднем на $65 \pm 10,9$ с и $72,3 \pm 8,2$ с; $106,1 \pm 19,7$ с и $109,7 \pm 16,6$ с (для левой и правой лапы соответственно), т.е. на 101% и 77%; 88% и 72% дольше интактных животных, и на 50% и 43%; 11% и 21% дольше, чем при их тестировании на 14 день после стенозирования ОСА. В группе животных с ЭСД 33% крыс не

сняли лейкопластырь с одной лапки, а 25% с двух, в то же время 40% и 30% животных, которым был смоделирован стеноз, не сняли пластырь с одной или обеих лап.

Моделирование у экспериментальных животных с ХНМК и на его фоне ЭСД приводило еще к более выраженным сенсомоторным нарушениям. Так, животные этой группы на 255% и 198%; 177% и 155% медленнее интактных обнаруживали и устраняли пластырь (для левой и правой лапы соответственно). Было отмечено также, что они на 83% и 87%; 77% и 69% медленнее животных с экспериментальным СД и стенозом обнаруживали и на 56% и 61%; 47% и 49% медленнее удаляли инородный предмет с левой и правой лапы соответственно. Также у животных с экспериментальным СД и ХНМК было отмечено, что сенсомоторные нарушения прогрессировали, поскольку они на 36% и 36%; 17% и 24% дольше, чем две недели ранее, обнаруживали и удаляли инородный предмет. С одной лапы не удалили пластырь 67%, а больше половины (56%) животных не удали пластырь с обеих лап.

У животных с экспериментальным СД и ХНМК, курсом получавших метформин и ситаглиптин, сенсомоторные нарушения были выражены меньше, чем у животных контрольной группы. По сравнению с результатами, полученными на 14 день лечения, крысы этих групп на 31% и 44%; 23% и 23% быстрее обнаруживали (для левой и правой лапы соответственно) и на 11% и 15%; 16% и 10% быстрее удаляли инородный предмет с левой и правой лапы соответственно. Половина животных, которые получали метформин, не удали пластырь с одной и 30% с обеих лап, а 40% животных, получавших ситаглиптин, не удалили его с обеих лап.

Курсовое введение животным с экспериментальным СД и ХНМК дипиарона оказывало более выраженное церебропротективное действие, чем применение метформина и ситаглиптина, значительно уменьшая время обнаружения и удаления инородного предмета с лап животными. Так, они обнаруживали инородный предмет на 16% и 22% быстрее контрольных и быстрее удаляли его на 16% и 21%, для левой и правой лапы соответственно. Обнаруживали и удаляли пластырь с лапки животные на 29% и 18%; 10% и 8% (для левой и правой лап соответственно) медленнее, чем через 14 дней после начала лечения. При этом только 33% животных не сняли пластырь с одной лапки и 22% с двух, что соответствует показателям группы, которую 28 дней лечили комбинацией метформина и ситаглиптина.

Комбинированное введение дипиарона и метформина (но не дипиарона и ситаглиптина), оказывает более выраженное гипогликемическое и церебропротективное действие. Так, животные с ЭСД и ХНМК, которым в течение 28-днев перорально вводили дипиарон в комбинации с метформином, на 37% и 35%; 30% и 33% быстрее контрольных обнаруживали и удаляли лейкопластырь, и только на 17% и 29%; 2% и 13% делали это медленнее, чем через 14 дней после начала лечения, что было быстрее, чем в остальных группах. При этом необходимо отметить, у животных получавших дипиарон симптомы сенсомоторного дефицита проявлялись в меньшей степени чем у получавших метформин, а концентрация глюкозы у них была наоборот выше, что указывает на наличие дополнительного и иного, чем снижение гипергликемии, механизма церебропротективного действия дипиарона.

Уровень мозгового кровотока достоверно различался у интактных, животных с ХНМК или ЭСД, и их комбинацией. Курсовое пероральное введение дипиарона, метформина, ситаглиптина или их комбинаций значимо не повышало уровень мозгового кровотока животных с экспериментальным СД и ХНМК, но в группах, получавших «лечение», он был выше, чем у тех, кому вводили физиологический раствор, приближаясь к значениям, зафиксированным у животных с ХНМК, но без диабета (рис.30).

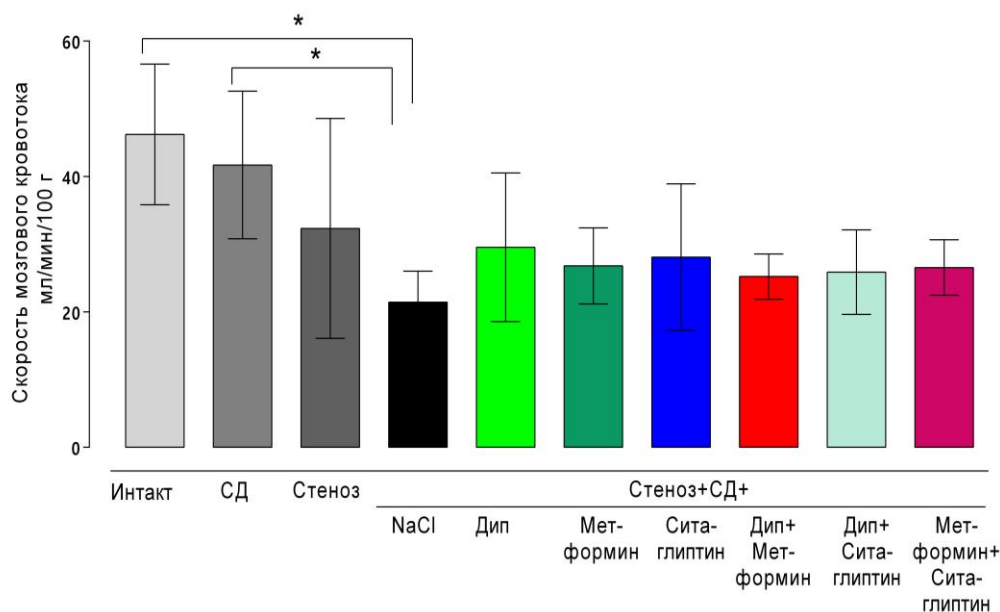


Рис. 30. Скорость мозгового кровотока животных СД и ХНМК через 28 дней лечения дипиароном, метформинном, ситаглиптином и их комбинациями.

Примечание: различия достоверны при $p \leq 0,05$, критерий Дана

Обобщая морфологические и морфометрические данные по различным структурам головного мозга (табл. 3), можно сделать вывод о том, что меньше дегенеративных изменений наблюдалось при лечении дипиароном, а также его комбинацией с ситаглиптином и метформинном.

В обсуждении приводится обобщение результатов, полученных в ходе исследования, их интерпретация с учетом литературных данных. В ходе настоящей работы были синтезированы, отобраны и проскринированы ряд соединений, обладающих выраженной агонистической активностью в отношении GPR119, была проведена оценка некоторых параметров первичной фармакодинамики, включающих установление в нескольких независимых сериях эксперимента эффективности на валидированной модели СД, в исследованиях *in vitro* и *in vivo* подтвердилась концепция возможности использования агонистов GPR119 с целью снижения концентрации глюкозы, подтвержден предполагаемый механизм действия, заключающийся в способности стимулировать секрецию ГПП-1. Проведен анализ зависимости выраженности гипогликемического эффекта от применяемой дозы, установлена эффективная доза. В ходе работы были установлены некоторые элементы вторичной фармакодинамики, плеiotропные эффекты соединения-лидера, включающие снижение массы тела у животных с ожирением и ограничение ее набора при изменении рациона на высококалорийный и жирный. Выявлено эндотелио- и церебропротективное действие. По результатам токсикологического исследования дипиарон признан малотоксичным, что в совокупности с комплексным противодиабетическим действием и некоторыми плеiotропными эффектами позволяет предположить его высокий терапевтический потенциал.

На основании представленных данных можно утверждать, что дипиарон обладает широким спектром биологической активности и отвечает современным требованиям, предъявляемым к противодиабетическим лекарственным средствам. Глюкозозависимое гипогликемическое действие, способность снижать массу тела, усиление репаративных процессов в β -клетках поджелудочной железы, наличие эндотелио- и церебропротективного действия, а также возможность комбинирования с другими противодиабетическими средствами и пероральная лекарственная форма выгодно отличают дипиарон от препаратов, существующих на современном фармацевтическом рынке.

Таблица 3

Морфологическая характеристика нейродегенеративных изменений нейронов и клеток глии в различных регионах головного мозга

Зона/Степень патоморфологических изменений		Группы животных									
		Интакт	ЭСД	ХНМК	ЭСД+ХНМК+						
					NaCl	Дип+Сит	Мет	Сит	Дип	Сит+Мет	Дип+Мет
Структуры гиппокампа											
CA1	НН	97,6±0,6	95,4±0,7	37,5±9,5	73,4±12,5	97,4±1,1	93,7±1,3	85,7±2,3	67,2±9	95,1±1,3	86,3±5,7
	СН	1,8±0,6	4,6±0,8	58,6±8,9	11,9±7	2,6±1,1	2,3±0,8	8,7±1,8	30,8±8,1*	3,5±0,7	11,2±4,4
	ГН	0,6±0,5	0,5±0,3	3,2±0,7	14,7±6,8	0,4±0,2	3,9±1,3	5,6±1,3	1,9±1,1	1,4±0,9	2,5±1,3
CA3+CA4	НН	96,4±1,1	83,2±2,4	5,3±2,2	39,2±11,6	86,1±2,1*	9,5±2,8*	27,9±10,6	55,9±4,3	25,8±8,8	51,1±5,2
	СН	2,8±1,2	11,6±1,6	77,4±4,2	16,2±3,6	13,9±2,1	60,3±4,8*	40,7±8,1*	34,9±4,4*	66,9±8,6*	39,2±4,5*
	ГН	0,8±0,4	5,2±1,4	17,3±3,3	44,6±10,8	1,5±0,6*	30,3±6,6	31,5±9,8	9,1±4,2*	7,3±2,8	9,7±1,2
Отделы коры головного мозга											
Моторная	НН	93,5±1,9	83,1±1,3	42,7±7,1	26,6±8,8	81,8±1,6*	72,9±3,2*	43,3±2,3	69,2±4,6*	63,8±3,4*	93,7±0,8*
	СН	5,9±1,9	12,5±1,4	43,1±5,8	58,5±9,1	14,4±1,3*	17,9±2,6*	33,6±2,7*	28,7±4,2*	29±2,4*	5,1±0,6*
	ГН	0,6±0,3	4,4±0,6	14,3±1,8	14,9±1,4	3,9±0,9*	9,1±1,3*	23,1±1,9*	2,2±0,6*	7,2±2,5*	1,3±0,3*
Соматосенсорная	НН	96,4±1,1	91,7±0,9	56,9±2,4	71,2±2,8	91,9±0,7*	63,7±2,3	86,6±2,1*	94,4±0,5*	58,9±2,2	95,3±0,5*
	СН	2,8±1,2	5,6±0,6	35,8±2,2	21,5±2,7	6,6±0,6*	23,4±1,6	4,5±0,5*	4,7±0,4*	32,8±2,9	4,2±0,4*
	ГН	0,8±0,4	2,8±0,6	7,3±0,9	7,4±0,8	1,5±0,3*	12,9±1,5*	5,9±1,9*	0,9±0,2*	8,3±1,8	0,5±0,1*

Примечание. * – показатели ($M \pm m \%$) статистически значимо отличаются от группы ЭСД+ХНМК при $p < 0,05$; Критерий Манна–Уитни. Степень поражения нейронов [Чубинидзе А.И., 1972]: нейроны нормальные, неизмененные (НН); слабоизмененные нейроны (СН) с сохранением ядра, но со структурными или тинкториальными нарушениями компонентов цитоплазмы (набухание, гиперхроматоз, хроматолиз, центральная тинкториальная ацидофилия); грубо измененные нейроны (ГН) –выраженное сморщивание, «тяжелое изменение», гомогенизирующее изменение нейронов, клетки-тени

ВЫВОДЫ

1. В результате целенаправленного поиска среди синтезированных производных диариллоксиметилпиперидина были выявлен ряд веществ с выраженной агонистической активностью к GPR119, но наиболее активным соединением оказалось синтезированное с хлорпиримидиновым заместителем (ZB-16, $EC_{50} = 7,25 \cdot 10^{-09} M$). В исследованиях *in vitro* оно не оказывало кардиотоксического (по параметру связывания с hERG) действия, не ингибировало ни одну из изоформ цитохрома P-450 (2C9-BOMF10, 3A4-BOMCC, 3A4-DBOMF, 1A2-EOMCC, 2C19-EOMCC, 2D6-EOMCC), а *in vivo* не оказывало общетоксического действия при пероральном однократном введении мышам и крысам обоего пола в дозе 2000 мг/кг.

2. Соединение 2-{4-[[4-(3,3-диоксо-1,3-бензоксатиол-6-ил)-2-фторфенокси]метил]пиперидин-1-ил}-5-хлорпиримидин (ZB-16, дипиарон) в дозах 0,1 до 1 мг/кг при курсовом пероральном введении в течение 28 дней животным с стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД снижает концентрацию глюкозы в крови на 35,8% и 36,6% (для доз 0,1 и 1 мг/кг соответственно) и повышает скорость ее утилизации при проведении перорального глюкозотолерантного теста, уменьшая AUC на 35,4% и 37,7% (соответственно) по сравнению со значениями до начала лечения соответственно.

3. Пероральное введение дипиарона молодым крысам (возраст 6–8 месяцев) при переводе их с обычной пищи на высококалорийную и жирную, ограничивает увеличение массы тела, так в опытной группе увеличение массы тела составило в среднем 3%, а у животных контрольной группы – 22,9%. Пероральное введение дипиарона в дозе 1 мг/кг животным с экспериментально вызванным ожирением у старых крыс (возраст 24 месяца) приводит к снижению массы тела на 4% от начальных значений, в то время как у контрольной группы масса тела увеличилась на 4,6%.

4. Механизм гипогликемического действия дипиарона связан с его способностью глюкозозависимо повышать уровень циркулирующего ГПП-1 (на 90%) и инсулина (на 38%) и снижать уровень глюкагона, что опосредовано его цитопротективным действием в отношении β -инсулоцитов поджелудочной железы и сопровождалось увеличением абсолютной и относительной площади инсулин-позитивного материала на 1136% и 18,7%, соответственно, снижением уровня апоптоза, о чем свидетельствует меньшая абсолютная и относительная площадь каспаза-3-позитивного материала в эндокриноцитах панкреатических островков на 41,9% и на 4,9%, соответственно, по сравнению с группой животных с экспериментальным сахарным диабетом, не получавших лечения.

5. Гипогликемическое действие дипиарона увеличивается при его комбинировании с метформином, при этом пероральное применение комбинации дипиарона (0,1 мг/кг) и метформина (400 мг/кг) приводит к сопоставимому с дозой 1 мг/кг (дипиарона) и 400 мг/кг (метформина) снижению концентрации глюкозы в крови (на 53,6% и 54,2% через 28 дней после начала лечения), измеренной после 6-часового голодания, и повышению скорости ее утилизации при проведении перорального глюкозотолерантного теста у животных с стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД (снижая AUC через 28 дней после начала лечения на 30,9% и 33,5% соответственно).

6. Дипиарон при курсовом применении оказывает выраженное эндотелио- и церебропротективное действие на моделях острого и хронического нарушения мозгового кровообращения, воспроизведенных на фоне экспериментального СД, снижая тяжесть возникающего психоневрологического дефицита по шкалам Combs и D'Alecy и Garcia, сенсомоторные (уменьшая на 16% и 22% время обнаружения инородного предмета на лапах в адгезивном тесте и на 231% и 122% увеличивая латентный период первого падения и общее время удержания на вращающемся стержне) и когнитивные нарушения, повышая эндотелийзависимую вазодилатацию мозговых сосудов (мозговой кровотока в ответ на введение ацетилхолина увеличивался на 28% против 14% в контрольной группе у животных с ОНМК).

7. Курсовое пероральное введение дипиарона животным с стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД и хроническим нарушением мозгового кровообращения оказывает выраженное церебропротективное действие, поскольку при морфометрическом анализе в структурах мозга этих животных было меньше нейродегенеративных изменений нейронов (в поле СА1 $1,9 \pm 1,1$ против $14,7 \pm 6,8$ в контрольной группе соответственно; $9,1 \pm 4,2$ против $44,6 \pm 10,8$ в полях СА3-4; $2,2 \pm 0,6$ против $14,9 \pm 1,4$ в моторной коре и $0,9 \pm 0,2$ против $7,4 \pm 0,8$ в сенсомоторной соответственно).

8. Полученные данные свидетельствуют о перспективности поиска и разработки на основе агонистов GPR119 нового класса противодиабетических лекарственных средств, стимулирующих выработку эндогенного ГПП-1 и инсулина, снижающих содержание глюкагона, обладающих гипогликемическим действием, уменьшающих апоптоз, увеличивающих регенерацию β -клеток поджелудочной железы и оказывающих вазо- и нейропротекторное действие.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Литературные данные и результаты собственных исследований позволяют рекомендовать поиск и разработку среди замещенных производных диарилоксиметилпиперидина новых высокоэффективных агонистов GPR119.

2. Полученные данные о высокой агонистической активности соединения ZB-16 к GPR119 и его выраженном гипогликемическом действии свидетельствуют о целесообразности разработке на его основе нового лекарственного средства для профилактики и лечения сахарного диабета, метаболического синдрома и их макрососудистых осложнений, в том числе острых и хронических нарушений мозгового кровообращения.

3. При изучении сахароснижающего действия новых агонистов GPR119 целесообразно изучать их ангио- и нейропротекторные свойства, поскольку их наличие позволит в дальнейшем при назначении агонистов GPR119 как гипогликемических препаратов снизить риск сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с сахарным диабетом 2 типа.

4. Результаты настоящего исследования о гипогликемическом действии и плейотропных эффектах агонистов GPR119 целесообразно включить в программу преподавания общей и клинической фармакологии в медицинских и фармацевтических вузах.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Структура и биологическая активность эндогенных и синтетических агонистов рецептора GPR119 / И.Н. Тюренков, А.А. Озеров, **Д.В. Куркин**, Е.О. Логвинова, Д.А. Бакулин, Е.В. Волотова, Д.Д. Бородин // Успехи химии. – 2018. – Т. 87. – № 2. – С. 151-166.

2. Оценка психоневрологического дефицита у грызунов: основные методы / Е. И. Морковин, **Д. В. Куркин**, И. Н. Тюренков // Журнал высшей нервной деятельности. – 2018. – Т. 68, № 1. – С. 3–15.

3. Методы моделирования острых нарушений мозгового кровообращения, применяемые при проведении доклинических исследований церебропротекторов / И.Н. Тюренков, **Д. В. Куркин**, А.А. Литвинов, Е.А. Логвинова, Е.И. Морковин, Д.А. Бакулин, Е.В. Волотова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – № 1 (22). – С. 186-197.

4. Нейропротективные свойства инкретиномиметиков при ишемии головного мозга и нейродегенеративных заболеваниях / И.Н. Тюренков, Д.А. Бакулин, **Д. В. Куркин**, Е.В. Волотова // Проблемы эндокринологии. – 2017. – Т. 63, № 1. – С. 58-67.

5. Сравнительная церебропротективная активность метформина, глосглиптина, цитиколина и нового агониста GPR119 при экспериментальной ишемии головного мозга

на фоне сахарного диабета / И. Н. Тюренков, **Д. В. Куркин**, Д. А. Бакулин, Е. В. Волотова, М. А. Шафеев // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2017. – №12-2. – С. 53-59.

6. Поведенческое фенотипирование крыс при экспериментальном моделировании хронического нарушения мозгового кровообращения / **Д.В. Куркин**, Е.И. Морковин, Д.В. Верхоляк, Н.А. Осадченко, И.Н. Тюренков, В.И. Петров // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2017. – Т. 117, № 7. – С. 69-73.

7. Изменение скорости мозгового кровообращения у крыс при экспериментальном моделировании стеноза общих сонных артерий / **Д.В. Куркин**, Е.И. Морковин, Д.В. Верхоляк, Д.А. Бакулин, Е.В. Волотова, И.Н. Тюренков // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2017. – № 1 (61). – С. 36-39.

8. Гиполипидемическое, антиоксидантное и эндотелиопозитивное действие нового агониста рецептора GPR 119 соединения ZB-16 при экспериментальном сахарном диабете / И.Н. Тюренков, **Д.В. Куркин**, Д.А. Бакулин, Е.В. Волотова, М.А. Шафеев // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80, № 1. – С. 18-23.

9. Роль микрофлоры кишечника, состава пищи, GPR41- и GPR43-рецепторов к короткоцепочечным жирным кислотам в энергетическом обмене позвоночных животных / И.Н. Тюренков, **Д.В. Куркин**, Е.В. Волотова, Д.А. Бакулин // Успехи физиологических наук. – 2017. – Т. 48, № 2. – С. 100-112.

10. Кардиоваскулярные эффекты инкретиномиметиков и их терапевтический потенциал / И.Н. Тюренков, Д.А. Бакулин, **Д.В. Куркин**, Е.В. Волотова // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2017. – Т. 72, № 1. – С. 66-75.

11. Влияние агониста рецептора GPR119 на выработку инсулина и инсулинорезистентность у интактных и животных с экспериментальным сахарным диабетом / **Д.В. Куркин**, Д.А. Бакулин, Е.В. Волотова, И.Н. Тюренков // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2017. – № 3 (63). – С. 60-63.

12. ZB-16, a novel GPR119 agonist, relieves the severity of streptozotocin-nicotinamide induced diabetes in rats / I.N. Tyurenkov, **D.V. Kurkin**, D.A. Bakulin, E.V. Volotova, M.A. Chafeev, A.V. Smirnov, E.I. Morkovin // Frontiers in Endocrinology. – 2017. – Т. 8, № JULY. – P. 1-8.

13. Сравнение гипогликемической активности нового агониста GPR119 и ингибитора ДПП-4 ситаглиптина / И.Н. Тюренков, **Д.В. Куркин**, Д.А. Бакулин, Е.В. Волотова, М.А. Шафеев // Проблемы эндокринологии. – 2016. – Т. 62, № 1. – С. 38-43.

14. Влияние агониста рецептора GPR119 на уровень глюкозы, массу тела и потребление пищи у животных с ожирением, обусловленным высокожировой и углеводной диетой / И.Н. Тюренков, **Д.В. Куркин**, Д.А. Бакулин, Е.В. Волотова, М.А. Шафеев // Проблемы эндокринологии. – 2016. – Т. 62, № 1. – С. 44-49.

15. Влияние нового агониста рецептора GPR119 соединения ZB-16 и ситаглиптина на уровень гликемии и инсулина, утилизацию глюкозы и структурные изменения в эндокринной части поджелудочной железы крыс при экспериментальном сахарном диабете 2-го типа / И.Н. Тюренков, **Д.В. Куркин**, Д.А. Бакулин, Е.В. Волотова, А.В. Смирнов, Д.С. Медников, М.А. Шафеев // Проблемы эндокринологии. 2016. – Т. 62, № 4. – С. 32-37.

16. Влияние нового агониста рецептора GPR119 соединения ZB-16 на коагуляционный гемостаз крыс при экспериментальном сахарном диабете / **Д.В. Куркин**, Е.В. Волотова, Д.А. Бакулин, М.А. Шафеев, И.Н. Тюренков // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета – 2016. – № 1 (57). – С. 48-51.

17. Гипогликемическое действие агониста GPR119 на модели развивающегося сахарного диабета / **Д.В. Куркин**, Д.А. Бакулин, Е.В. Волотова, М.А. Шафеев, И.Н. Тюренков, Е.О. Логвинова // Вестник Волгоградского государственного медицинского

университета. – 2016. – № 3 (59). – С. 104-108.

18. Система инкретинов как перспективная фармакологическая мишень для сахароснижающей терапии / **Д.В. Куркин**, Е.В. Волотова, Д.А. Бакулин, Е.М. Ломкина, И.Н. Тюренков // Фарматека. – 2016. – № 5 (318). – С. 45-50.

19. Церебропротекторная активность разных доз агониста GPR119 – соединения ZB-16 при экспериментальной ишемии головного мозга / Д.А. Бакулин, **Д.В. Куркин**, Е.В. Волотова, М.А. Шафеев, И.Н. Тюренков // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – С. 145.

20. Агонисты GPR119 рецепторов: характеристика, физиологическая роль и перспективы использования в терапии сахарного диабета 2 и метаболического синдрома / И.Н. Тюренков, Д.А. Бакулин, **Д.В. Куркин**, Е.М. Ломкина, Е.В. Волотова // Успехи физиологических наук. – 2015. – Т. 46, № 4. – С. 28-37.

21. Десять новых мишеней для разработки лекарственных средств для лечения сахарного диабета 2 типа и метаболического синдрома / И.Н. Тюренков, **Д.В. Куркин**, Е.В. Волотова, Д.А. Бакулин, Е.М. Ломкина // Сахарный диабет. – 2015. – Т. 18, № 1. – С. 101-109.

Патенты РФ

1. Замещенные 4-{{[4-(3,3-диоксидо-1,3-бензоксатиол-6-ил)арилокси]метил} пиперидины как агонисты рецепторов grpr119, фармацевтическая композиция, способы их получения и применения Иващенко А.В., Иващенко А.А., Кравченко Д.В., Шафеев М.А., Гезенцевой Ю.А., Юдин М.В., Петров В.И., Тюренков И.Н., **Куркин Д.В.**, Волотова Е.В., Бакулин Д.А. патент на изобретение RUS 2576037 28.11.2014

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЧТВ – активированное частично
тромбопластиновое время
ДА – двигательная активность
ИРМ – иммунореактивный материал
ИС – иммунная система
ЛО – ложнооперированные животные
ЛП – латентный период
МК – мозговой кровоток
НМК – нарушение мозгового
кровообращения
НПГ – недостаточность половых
гормонов
ОИА – ориентировочно-
исследовательская активность
ОП – открытое поле
ОСА – окклюзия общих сонных артерий
ОСМА – окклюзии средней мозговой
артерий
ПВ – протромбиновое время

ПКЛ – приподнятый крестообразный
лабиринт
ПОЛ – перекисное окисление липидов
СОД – супероксиддисмутаза
СРБ – С-реактивный белок
ТВ – тромбиновое время
ТЭИ – тест экстраполяционного
избавления
УРПИ – условный рефлекс пассивного
избегания
ФВ – фактор Виллебранда
ХНМК – хроническое нарушение
мозгового кровообращения
ЦНС – центральная нервная система
ЭД – эндотелиальная дисфункция
ЭЗВД – эндотелийзависимая
вазодилатация
ЭНВД – эндотелийнезависимая
вазодилатация

Куркин Денис Владимирович

ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И НЕКОТОРЫЕ
ПЛЕЙОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ АГОНИСТОВ GPR119 РЕЦЕПТОРА И ИХ
КОМБИНАЦИЙ С ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук