

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Волгоградский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

**БАКУЛИН ДМИТРИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА  
GPR119 ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО  
МОЗГА НА ФОНЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

**НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:**  
член-корреспондент РАН,  
доктор медицинских наук,  
профессор  
Тюренокв Иван Николаевич

ВОЛГОГРАД, 2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>7</b>
<b>ГЛАВА 1. Гипогликемические препараты с инкретиновой активностью и сосудистые осложнения сахарного диабета. Место агонистов рецептора GPR119 в терапии сахарного диабета и профилактике осложнений .....</b>	<b>13</b>
1.1 Сосудистые осложнения сахарного диабета.....	13
1.1.2. Особенности течения ишемии головного мозга при сахарном диабете .....	14
1.2.    Терапия ишемического инсульта. ....	15
1.2.1. Профилактика и лечение ишемического инсульта у пациентов с сахарным диабетом.....	16
1.3.    Система инкретинов, регуляция углеводного обмена и метаболические эффекты .....	18
1.3.1. Плейотропные свойства средств с инкретиновой активностью ..	20
1.3.2. Точки приложения действия инкретиномиметиков при нейродегенеративных и ишемических поражениях головного мозга...	24
1.4. Сенсоры жирных кислот и метаболизм глюкозы .....	32
1.4.1. Рецептор GPR119. Строение. Функции. Механизм активации. ..	33
1.4.2. Агонисты рецептора GPR119, как новая группа сахароснижающих средств .....	34
1.4.3. Перспективы использования агонистов рецептора GPR119 в качестве церебропротекторов при нарушениях мозгового кровообращения на фоне сахарного диабета .....	35
<b>ГЛАВА 2. Материалы и методы.....</b>	<b>38</b>
2.1. Экспериментальные животные.....	38
2.2. Исследуемое соединение и препараты сравнения.....	39
2.3. Дизайн исследования .....	40
2.3.1. Исследование церебропротекторного потенциала ZB-16 в разных дозах при моделировании окклюзии общих сонных артерий у интактных животных .....	42

2.3.2. Исследование церебропротекторного действия ZB-16 при моделировании фокальной ишемии ГМ на фоне сахарного диабета..	43
2.3.3. Исследование механизмов церебропротекторного действия соединения ZB-16 .....	45
2.4. Моделирование стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного сахарного диабета .....	46
2.4.1. Оценка гипогликемической активности исследуемых соединений.....	47
2.4.2. Определение уровня инсулина и ГПП-1 в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.....	47
2.5. Моделирование ишемического повреждения головного мозга .....	48
2.5.1. Выполнение необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий .....	48
2.5.2. Выполнение процедуры временной окклюзии средней мозговой артерии по методу J. Koizumi .....	49
2.6. Оценка степени психоневрологического дефицита .....	52
2.6.1. Оценка неврологического дефицита по шкале McGraw .....	52
2.6.2. Оценка неврологического дефицита по шкале Garcia .....	53
2.6.3. Оценка неврологического дефицита по шкале Combs и D'Alecy .....	54
2.6.4. Оценка нарушений координации движений в тесте «Ротарод»	54
2.6.5. Оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в тесте «Открытое поле».....	55
2.6.6. Оценка когнитивного дефицита в тестах ТЭИ и УРПИ .....	55
2.7. Изучение параметров тромбоцитарного и коагуляционного компонента гемостаза .....	57
2.7.1. Изучение параметров коагуляционного компонента гемостаза	57
2.7.2. Исследование тромбоцитарного компонента гемостаза.....	57
2.8. Оценка эндотелийзависимой вазодилатации .....	58
2.9. Определение концентрации ТБК-активных продуктов в плазме .....	58

2.10. Оценка кислотной резистентности эритроцитов .....	59
2.11. Статистическая обработка результатов исследования.....	59
<b>ГЛАВА 3. Изучение церебропротекторного потенциала ZB-16 в разных дозах при моделировании окклюзии общих сонных артерий у интактных животных .....</b>	<b>60</b>
3.1. Оценка летальности после ООСА.....	60
3.2. Оценка неврологического дефицита по шкале McGraw.....	61
3.3. Оценка нарушений координации движений в тесте «Ротарод» .....	62
3.4. Оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в тесте «Открытое поле».....	64
3.5. Оценка когнитивного дефицита в тестах ТЭИ и УРПИ .....	65
Заключение .....	66
<b>ГЛАВА 4. Исследование влияния лечебно-профилактического введения агониста рецептора GPR119 и препаратов сравнения на течение ишемического процесса при окклюзии средней мозговой артерии на фоне сахарного диабета.....</b>	<b>68</b>
4.1. Выбор продолжительности окклюзии СМА для использования в качестве модели фокальной ишемии у животных с СД .....	69
4.2. Оценка неврологического дефицита по шкале Garcia .....	71
4.3. Оценка неврологического дефицита по шкале Combs и D'Alecy.....	73
4.4. Оценка нарушений координации движений в тесте «Ротарод» .....	75
4.5. Оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в тесте «Открытое поле».....	76
4.6. Оценка когнитивного дефицита в тестах ТЭИ и УРПИ .....	79
4.7. Оценка объема инфаркта и степени отека ГМ у животных с фокальной ишемией на фоне сахарного диабета.....	80
4.8. Оценка содержания ТБК-активных продуктов у животных с фокальной ишемией ГМ на фоне сахарного диабета.....	82
4.9. Оценка кислотной резистентности эритроцитов у животных с фокальной ишемией ГМ на фоне сахарного диабета.....	83

Заключение .....	84
<b>ГЛАВА 5. Определение механизмов церебропротекторного действия агониста рецептора GPR119– соединения ZB-16 .....</b>	<b>86</b>
5.1. Исследование противодиабетического действия агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16 у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД. ....	86
5.1.1. Исследование гипогликемической активности ZB-16 при курсовом введении в разных дозах .....	87
5.1.2. Изучение влияния соединения ZB-16 на уровень ГПП-1, инсулина и глюкозы в крови при глюкозной нагрузке .....	90
5.2. Исследование функционального состояния эндотелия и параметров гемостаза у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, получавших агонист рецептора GPR119 .....	94
5.2.1. Исследование функционального состояния эндотелия у животных с экспериментальным СД, получавших агонист рецептора GPR119 .....	95
5.2.2. Исследование параметров коагуляционного гемостаза у животных с экспериментальным СД, получавших агонист рецептора GPR119 .....	97
5.2.3. Исследование параметров тромбоцитарного компонента гемостаза у животных с экспериментальным СД, получавших агонист рецептора GPR119 .....	99
5.3. Исследование функционального состояния эндотелия и параметров гемостаза у животных с ишемией ГМ на фоне стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД, получавших агонист рецептора GPR119	100
5.3.1. Исследование функционального состояния эндотелия у животных с ишемией ГМ на фоне сахарного диабета, получавших агонист рецептора GPR119 .....	101

5.3.2. Исследование параметров коагуляционного гемостаза у животных с ишемией ГМ на фоне сахарного диабета, получавших агонист рецептора GPR119 .....	102
5.3.3. Исследование параметров тромбоцитарного компонента гемостаза у животных с ишемией ГМ на фоне сахарного диабета, получавших агонист рецептора GPR119 .....	103
Заключение .....	104
<b>ГЛАВА 6. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....</b>	<b>108</b>
Заключение .....	121
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>122</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....</b>	<b>123</b>
<b>ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....</b>	<b>124</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>126</b>

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность**

По оценкам Международной диабетической федерации в начале 2015 года количество людей с сахарным диабетом в мире насчитывало 415 миллионов [Дедов И.И., 2015а]. В России по данным Министерства здравоохранения в то же время количество больных СД составляло 4,04 млн человек, а по оценкам экспертов эта цифра несколько выше и насчитывает 5,9 млн человек [Дедов И.И., 2016; Недогода С.В., 2015].

Наличие СД 2 типа повышает риск развития инсульта в 3-7 раз, а риск смерти от инсульта в 3-4 раза по сравнению с пациентами без диабета [Гудкова В.В., 2015]. В России ежегодно инсульт развивается у 450 тыс. человек, из которых около 35% умирают в остром периоде [Гусев Е.И., 2014].

С учетом значительного роста числа пациентов с СД 2 типа, на фоне увеличения продолжительности жизни и старения населения [Рязанцев С.В., 2014], большой интерес представляют противодиабетические препараты, которые помимо гипогликемического действия способны снижать риск развития сердечно-сосудистых осложнений и снижать последствия инсульта у пациентов с СД [Спасов А.А., 2013].

Десять лет назад на рынок вышли первые препараты с инкретиновой активностью (ингибиторы дипептидилпептидазы-4 и аналоги глюкагоноподобного пептида-1), сейчас их уже 15 из которых 9 появились на рынке в России [Дедов И.И., 2013; Спасов А.А., 2015; Тюренков И.Н., 2015]. По данным клинических наблюдений показано снижение количества фатальных и нефатальных сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с СД 2 типа при применении аналогов глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) [Marso S.P., 2016; Ratner R., 2011]. Однако, церебропротекторное действие инкретиномиметиков при нарушениях мозгового кровообращения изучено недостаточно [Власов Т.Д., 2016].

Выбор сахароснижающей терапии влияет не только на риск развития сердечно-сосудистых осложнений у пациента с СД 2 типа, но также может

оказать влияние на тяжесть течения ишемического инсульта, поскольку на фоне базового лечения инсульта пациент продолжает получать гипогликемическую терапию. С этой позиции инкретиномиметики также привлекают внимание, поскольку по данным экспериментальных работ можно предполагать у них наличие нейропротекторного действия при ишемии головного мозга [Симаненкова А.В., 2014; Ma M., 2015; Gonçalves A., 2016].

Это делает актуальным изучение новых подходов к воздействию на систему инкретинов, в частности, в стимуляции их секреции посредством активации рецептора GPR119 на энтероэндокринных клетках кишечника [Спасов А.А., 2013, 2015; Тюренков И.Н., 2015, 2016], что приводит к глюкозозависимому повышению секреции инкретинов (ГПП-1 и ГИП) и инсулина.

### **Степень разработанности проблемы**

По результатам клинических исследований у пациентов с СД 2 типа, инкретиномиметики выражено уменьшали уровень гликозилированного гемоглобина, а также умеренно снижали артериальное давление и массу жировой ткани [Аметов А.С., 2011; Мкртумян А.М., 2015; Сухарева О.Ю., 2012].

Накопленные данные указывают на наличие у инкретиномиметиков плейотропных, в том числе и нейропротекторных, свойств, которые реализуются благодаря наличию рецептора к ГПП-1 на нейронах, клетках микроглии и эндотелиоцитах. Установлена его способность запускать важнейшие внутриклеточные сигнальные пути, поддерживающие функциональную активность клетки и ингибирующие апоптоз в патологических условиях [Аметов А.С., 2014а; Сухарева О.Ю., 2012].

Средства с инкретиновой активностью способны ингибировать процессы апоптоза кардиомиоцитов [Аметов А.С., 2014а] и нейронов [Власов Т.Д., 2016] в условиях ишемии, а также улучшать функциональное состояние эндотелия при гипергликемии, посредством активации eNOS [Wei R., 2016],

ингибирования экспрессии молекул адгезии [Krasner N.M., 2014] и процессов апоптоза [Zhan Y., 2012].

Агонисты рецептора GPR119 позиционируются как пероральные гипогликемические средства для длительного применения у больных СД 2 типа [Спасов А.А., 2015; Тюренков И.Н., 2015]. В настоящее время 10 агонистов названного рецептора проходят клинические испытания в качестве препаратов для лечения СД 2 типа и ожирения [Ritter K., 2016]. С учетом большого интереса к системе инкретинов в последние годы и высокого риска развития инсульта у больных СД представляется целесообразным провести исследование церебропротекторного потенциала агониста рецептора GPR119 при ишемии головного мозга в условиях сахарного диабета в эксперименте.

### **Цель исследования**

Экспериментальное обоснование применения агониста рецептора GPR119 в качестве церебропротектора при ишемии головного мозга на фоне сахарного диабета.

### **Задачи исследования.**

1. Оценить выраженность церебропротекторного действия нового агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16 при его лечебно-профилактическом введении животным с ишемией головного мозга по влиянию на летальность, выраженность неврологического и когнитивного дефицита.

2. Проанализировать зависимость церебропротекторного действия исследуемого соединения от используемых доз при моделировании экспериментальной ишемии головного мозга на интактных животных.

3. Изучить влияние лечебно-профилактического введения агониста рецептора GPR119, соединения ZB-16 на размер инфаркта и степень отека головного мозга, выраженность неврологического, когнитивного дефицита и содержание продуктов перекисного окисления при моделировании фокальной ишемии головного мозга на фоне стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД.

4. Провести углубленное изучение возможных механизмов церебропротекторного действия агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16, оценив его гипогликемические свойства, влияние на секрецию инкретинов, а также

вазодилатирующую функцию эндотелия, плазменный и тромбоцитарный компонент гемостаза у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД и при фокальной ишемии головного мозга в условиях стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД.

### **Научная новизна исследования**

Впервые проведено исследование влияния агониста рецептора GPR119 на течение экспериментальной ишемии головного мозга на фоне сахарного диабета: влияние соединения ZB-16 на размер инфаркта и степень отека головного мозга, выраженность неврологического дефицита. Изучены его эндотелиопротекторные, антиоксидантные свойства и влияние на коагуляционный гемостаз при моделировании ишемии головного мозга на фоне сахарного диабета в эксперименте.

Впервые проведено изучение гипогликемической активности агониста рецептора GPR119 нового, оригинального соединения ZB-16 на животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД с оценкой влияния соединения на секрецию инкретинов и инсулина при глюкозной нагрузке.

### **Научно-практическая ценность и реализация результатов работы**

Полученные данные о церебропротекторном действии агониста рецептора GPR119, соединения ZB-16 свидетельствуют о перспективности разработки на основе данного соединения перорального гипогликемического средства для лечения сахарного диабета 2 типа с дополнительными церебропротекторными свойствами.

Полученные в работе данные используются химиками-синтетиками АО "Исследовательского Института Химического Разнообразия" (г. Химки, РФ) при целенаправленном синтезе и поиске агонистов рецептора GPR119, а также в учебном процессе на кафедре фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей и в лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств НИИ фармакологии ВолгГМУ.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Соединение ZB-16 оказывает церебропротекторное действие при экспериментальной ишемии головного мозга на фоне сахарного диабета, снижая размер инфаркта и степень отека головного мозга, выраженность психоневрологического дефицита, содержание продуктов перекисного окисления липидов и улучшая вазодилатирующую и антитромботическую функцию эндотелия.

2. Агонист рецептора GPR119 – соединение ZB-16 в условиях стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД, посредством значимого повышения секреции инкретинов и инсулина, оказывает выраженное гипогликемическое действие, сопоставимое с таковым у ингибитора ДПП-4 гозоглиптина и незначительно уступая по эффективности метформину.

3. Механизм церебропротекторного действия агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16 в условиях сахарного диабета обусловлен его инкретинопосредованной гипогликемической, эндотелиотропной и нейропротекторной активностью.

### **Методология исследования**

Экспериментальное исследование было проведено с учетом рекомендаций по доклиническому изучению средств для лечения нарушений мозгового кровообращения [Мирзоян Р.С. и соавт., 2012], а также пероральных лекарственных средств для лечения сахарного диабета [Спасов А.А. и соавт., 2012]. В проведенном исследовании использовался комплексный подход по оценке церебропротекторного действия соединения ZB-16 при ишемии головного мозга на фоне стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД. Дизайн исследования соответствовал цели и задачам, а также этическим правилам работы с лабораторными животными. При планировании использовались рекомендации отечественных и зарубежных специалистов.

Исследование выполнено с использованием достаточного количества животных, современного оборудования и валидных методов, позволяющих получить достоверные данные.

### **Личный вклад автора**

Автор принимал непосредственное участие в планировании и выполнении всех этапов работы. Проведен анализ опубликованных за последние 5 лет экспериментальных и обзорных работ, касающихся темы диссертации, с учетом чего разработаны дизайн исследования, протоколы экспериментов и описаны полученные результаты. Автор принимал активное участие в написании обзорных и оригинальных статей по теме диссертации.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

При выполнении работы, использовалось современное, высокотехнологичное оборудование и современные методы исследования. Анализ экспериментальных данных был выполнен с использованием современного программного обеспечения и корректных методов и критериев статистического анализа, что говорит о высокой степени достоверности результатов исследования. Основные материалы работы были представлены на 72-,73-,74-ой открытой научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2014, 2015 диплом III степени, 2016 диплом III степени); V Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения-2013» (Санкт-Петербург, 2013). По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 5 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Получен 1 патент на изобретение.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 3 глав исследований, обсуждения результатов, выводов и списка используемой литературы, включающего 181 источник, из них отечественных 89 и зарубежных 92. Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста, содержит таблиц – 8, рисунков – 33.

# **ГЛАВА 1. Гипогликемические препараты с инкретиновой активностью и сосудистые осложнения сахарного диабета. Место агонистов рецептора GPR119 в терапии сахарного диабета и профилактике осложнений**

## **1.1 Сосудистые осложнения сахарного диабета**

Согласно последним данным Международной диабетической федерации (IDF) в конце 2015 года численность больных сахарным диабетом (СД) в мире составила 415 млн человек и к 2040 году по прогнозам IDF сахарным диабетом на планете будут страдать 642 млн человек [Дедов И.И., 2015a]. По результатам национального эпидемиологического кросс-секционного исследования NATION, проведенного в 2013-2015 годах в России, были сделаны выводы: распространенность преддиабета среди взрослого населения в нашей стране составляет 19,3%, а СД 2 типа имеется у 5,4% (около 5,9 млн человек) взрослого населения, при этом у более половины больных еще не поставлен диагноз [Дедов И.И., 2016].

Наличие СД 2 типа в анамнезе повышает риск развития инсульта в 3-7 раз, а риск смерти от инсульта 3-4 раза по сравнению с пациентами без диабета [Гудкова В.В., 2015; Недогода С.В., 2015]. В России ежегодно инсульт развивается у 450 тыс. человек, из которых около 35% умирают в остром периоде [Гусев Е.И., 2014]. Значительную часть переживших инсульт составляют лица с СД и нарушениями углеводного обмена [Какорин С.В., 2013; Шестакова М.В., 2016].

В основе сосудистых осложнений сахарного диабета лежит нарушения функций эндотелия, атеросклеротическое поражение и воспаление сосудистой стенки на фоне прокоагулянтных сдвигов в гемостазе и склонности к тромбогенезу [Оскола, Е.В., 2013; Тюренков И.Н., 2012б, 2013; Кособян Е.П., 2012; Стаценко М.Е., 2016; Ярек-мартынова И.Р., 2004].

Механизмы повреждения сосудистого русла и развития эндотелиальной дисфункции многообразны. Это в первую очередь образование и накопление

конечных продуктов гликирования белков (КПГ) в субэндотелиальном пространстве, активация свободнорадикальных процессов, накопление и окисление в интиме липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) и адгезия моноцитов с развитием воспаления [Булаева Н.И., 2013; Кособян Е.П., 2012; Чернов Ю.Н., 2010; Ярек-мартынова И.Р., 2004; Eriksson L., 2015]. Клинически значимая эндотелиальная дисфункция характеризуется нарушением равновесия между процессами вазоконстрикции и вазодилатации, усилением агрегации тромбоцитов, повышением продукции провоспалительных цитокинов, транс-эндотелиальным транспортом ЛПНП и пролиферацией гладкомышечных клеток, что приводит к уменьшению просвета сосуда, склонности к тромбообразованию, воспалению и утолщению сосудистой стенки [Асташев П.Е., 2011; Тюренков И.Н., 2012б, 2013; Ярек-мартынова И.Р., 2004; Eriksson L., 2015].

### **1.1.2. Особенности течения ишемии головного мозга при сахарном диабете**

У пациентов с сахарным диабетом инсульт в более чем 90% случаев протекает по ишемическому типу, однако выраженная гипергликемия может способствовать геморрагической трансформации очага поражения [Ермолаева А.И., 2009].

Тяжесть течения инсульта при сахарном диабете выше, чем у пациентов с нормальным уровнем глюкозы, что является следствием многих факторов, в том числе метаболических нарушений, эндотелиальной дисфункции, истощением компенсаторных и адаптивных возможностей организма, наличием макро- и микроангиопатий. Предшествующие инсульту изменения в сосудах, обусловленные длительной гипергликемией, приводят к большим размерам очага некроза, ускорению некротизирования пенумбры, вследствие чего, возрастает тяжесть мозгового инсульта и число летальных исходов (40,3-59,3%), а у выживших больных имеют место более выраженные психоневрологические нарушения [Гудкова В.В., 2015; Дедов И.И., 2015в; Аметов А.С., 2014б]. У пациентов с ишемическим инсультом (ИИ),

развившемся на фоне гипергликемии, отмечается значительное ухудшение функционального состояния эндотелия и усугубление этих нарушений с прогрессированием ишемического поражения. Выраженность эндотелиальных нарушений может быть одним из прогностических маркеров тяжести течения ИИ. Это делает актуальным создание и внедрение в клиническую практику гипогликемических средств, улучшающих функциональное состояние эндотелия [Расулова Х.А., 2013; Щепанкевич Л.А., 2012].

Таким образом поиск эффективных средств установления гипогликемического контроля и обладающих дополнительным профилактическим действием в отношении сердечно-сосудистых рисков остается актуальной фармакологической задачей.

## **1.2. Терапия ишемического инсульта**

Терапия ишемического инсульта в настоящее время направлена на скорейшее и эффективное восстановление кровотока в обтурированных сосудах (реперфузии) в первые часы заболевания, что позволяет предотвратить развитие необратимого повреждения вещества головного мозга либо уменьшить его объем. Наиболее эффективным методом терапии ИИ является системный тромболизис с использованием рекомбинантного тканевого активатора плазминогена (rt-PA) в первые 4,5 ч после развития симптоматики в соответствии с рекомендациями Европейской инсультной организации (ESO) и Американской ассоциации сердца и инсультной ассоциации (AHA/ASA; класс доказательности 1, уровень А) [Шамалов Н.А., 2014; Стаховская Л.В., 2014;]. Тромболизис может осуществляться лишь после исключения геморрагического характера поражения мозга. Также по рекомендации ESO для вторичной профилактики ишемического инсульта показано назначение низких доз аспирина (класс доказательности I, уровень А) [Парфенов В.А., 2009; Мельникова Е.В., 2011]. В острейшем периоде ИИ в зависимости от состояния пациенту также проводят общие терапевтические мероприятия: купирование

гипертонического криза, аритмии, нарушения дыхания, судорожного синдрома, гиповолемии и гипертермии если это необходимо [Парфенов В.А., 2009].

Доказанность эффективности нейропротекторов при ИИ остается на менее высоком уровне и после проведения ряда мета-анализов клинических исследований (КИ) были выделены несколько нейропротекторов, применение которых ассоциировано с улучшением неврологических показателей в восстановительном периоде. В данной группе препаратов выделяется цитиколин (цитидин-5-дифосфохолин), который является предшественником ацетилхолина и участвует в синтезе фосфолипидов мембран клетки. Проведено 3 мета-анализа КИ цитиколина при ИИ. Показано, что по данным нейровизуализации при назначении препарата был существенно снижен объем пораженных тканей головного мозга, также отмечено некоторое влияние на восстановление утраченных функций и показатель ранней смерти. Эффективность цитиколина отмечена в Европейских рекомендациях по лечению инсульта и транзиторных ишемических атак, разработанных Европейской организацией по борьбе с инсультом в 2008 г [Воробьев П.А., 2013].

### **1.2.1. Профилактика и лечение ишемического инсульта у пациентов с сахарным диабетом**

Формирование сосудистых осложнений у пациентов с СД 2 типа начинается задолго до постановки диагноза. При лечении СД 2 типа одной из главных задач является снижение риска развития сердечно-сосудистых осложнений заболевания [Спасов А.А., 2013; Тюренков И.Н., 2015].

Строгий контроль гликемии значительно снижает риск развития микро- и макрососудистых осложнений СД, что было показано во множестве клинических исследованиях при СД 1 типа (DCCT/EDIC) и при СД 2 типа (UKPDS, ACCORD, ADVANCE, VADT и др.) [Kishore P., 2012]. При повышении концентрации HbA<sub>1c</sub> до 9,5% увеличивается риск развития микрососудистых осложнений СД 2 типа в 10 раз, а макрососудистых – в 2 раза

(исследование UKPDS) [Гудкова В.В., 2015; Какорин С.В., 2016]. Снижение HbA1c на 1% уменьшает риск смерти от сердечно-сосудистых осложнений у диабетиков на 7,5% и возникновения других сердечно-сосудистых заболеваний на 13% при СД 2 типа [Lorber D., 2013; Saraiva F., 2014].

Однако добиться тощачковой нормогликемии – не означает значительно снизить риск макрососудистых осложнений для пациента [Anagnostis P., 2013; Eriksson L., 2015; Tate M., 2015], поскольку контроль уровня гликемии натощак не исключает значительного и продолжительного повышения постпрандиального уровня глюкозы с запуском соответствующих патофизиологических процессов. Отмечено, что риск развития сердечно-сосудистых осложнений СД коррелирует со степенью постпрандиального повышения глюкозы. Прием пищи с последующим повышением гликемии и триглицеридемии может значительно ухудшить функцию эндотелия сосудов на несколько часов у больных СД 2 типа. В это время у них наблюдается повышение маркеров оксидативного стресса и воспаления, а также ухудшение эндотелийзависимой вазодилатации. При этом степень постпрандиальной гипергликемии может зависеть не только от диеты и тяжести СД 2 типа, но и от специфики, подобранной сахароснижающей терапии [Недогода С.В., 2015; Стаценко М.Е., 2011; Kitasato L., 2012].

Последние рекомендации по ведению больных с сахарным диабетом 2 типа акцентируют внимание на раннем начале лечения с применением препаратов, нормализующих постпрандиальный уровень гликемии и снижающих риск сердечно-сосудистых осложнений СД [Дедов И.И., 2015а,б].

При лечении ишемического инсульта у пациентов с СД 2 типа наряду с базовой терапией, большое внимание уделяется нормализации и строгому контролю уровня гликемии. При этом такие факторы, как стрессовая ситуация, нарушение питания и применяемые препараты (гепарин, ацетилсалициловая кислота, тиазидные диуретики, бета-адреноблокаторы и др.) могут влиять на

углеводный обмен и способствовать гипер- или гипогликемии [Гудкова В.В., 2015; Стаховская Л.В., 2014].

Проведение тромболизиса при инсульте у пациентов с СД 2 сопряжено с большим риском геморрагической трансформации инфаркта мозга и в настоящее время активно обсуждается. После острого периода инсульта дальнейшая терапия направлена на профилактику повторного инсульта и нормализацию артериального давления [Какорин С.В., 2013; Стаховская Л.В., 2014; Щепанкевич Л.А., 2012].

### **1.3. Система инкретинов, регуляция углеводного обмена и метаболические эффекты**

Гипогликемическая терапия должна подбираться таким образом, чтобы исключить возникновение длительных и значительных подъемов уровня глюкозы в крови даже после приема пищи [Дедов И.И., 2015а,б; Какорин С.В., 2016; Мкртумян А.М., 2008а,б; Eriksson L., 2015]. Другими словами, гипогликемическое действие современного препарата должно усиливаться при подъеме концентрации глюкозы в крови выше физиологических значений и ослабляться при достижении нормальных значений. Такими качествами обладают средства, влияющие на систему инкретинов, сахароснижающий эффект которых имеет глюкозозависимый характер действия с отсутствием риска развития гипогликемии [Аметов А.С., 2013; Спасов А.А., 2015; Тюренков И.Н., 2015; Шестакова М.В., 2012].

Первые работы, посвящённые изучению инкретинов были начаты еще в 1906 г Moore и соавторами, которые предположили наличие в экстракте двенадцатиперстной кишки гормона с гипогликемическим эффектом, а La Barre в 1932 дал ему название «инкретин». В 1964 г. Elrick и соавторы открыли «инкретиновый эффект» – секреция большего количества инсулина при пероральном введении глюкозы, по сравнению с количеством инсулина при ее внутривенном введении. Позже было подсчитано, что около 50-70% постпрандиальной секреции инсулина стимулировано инкретинами, которые

вырабатываются в ответ на поступление пищи в кишечник [Спасов А.А., 2015; Тюренков И.Н., 2015]. Также инкретины снижают секрецию глюкагона (ГПП-1) и моторную активность желудка и ускоряют наступление чувства насыщения. В дополнение к метаболическим эффектам, инкретины оказывают трофические эффекты в отношении бета-клеток: стимулируя пролиферацию и дифференцировку, ингибируя апоптоз и повышая выживаемость бета-клеток поджелудочной железы [Тюренков И.Н., 2015; Ленская К.В., 2011; Спасов А.А., 2015].

Из ряда кишечных гормонов с инкретиноподобным действием выделяют 2 основных: глюкагон-подобный пептид-1 (ГПП-1, GLP-1) и глюкозозависимый инсулиноотропный пептид (ГИП, GIP). ГПП-1 секретируется в 2х эквивалентных по активности формах: ГПП-1(7-37) и ГПП-1(7-36)амид, который больше секретируется после еды [Тюренков И.Н., 2015; Спасов А.А., 2015; Eriksson L., 2015]. Основная часть ГПП-1 производится L-клетками тощей и подвздошной кишки, а ГИП – K-клетками двенадцатиперстной и тощей кишки. Тощаковый плазменный уровень ГПП-1 находится в диапазоне 5-10 пмоль/л и увеличивается после приема пищи до 15-50 пмоль/л ( $t_{1/2}$  для ГПП-1 составляет 2 мин). Уровень ГИП при этом изменяется от 20-30 пмоль/л до 300 пмоль/л после приема пищи, возвращаясь, как и у ГПП-1, к исходному уровню в течение 3-х часов ( $t_{1/2}$  для ГИП составляет 5-7 мин) [Eriksson L., 2015; Messenger B., 2003]. Разрушаются инкретины широко распространенным ферментом дипептидилпептидазой-4 (ДПП-4), который отщепляет N-терминальный дипептид от ГПП-1(7-36)амид и ГПП-1(7-37) с образованием неактивных метаболитов [Anagnostis P., 2013].

ГПП-1 способен стимулировать глюкозозависимую секрецию инсулина, снижать секрецию глюкагона, перистальтику желудка и аппетит. ГИП также активирует секрецию инсулина, но способен стимулировать и секрецию глюкагона. При СД 2 типа наблюдается ослабление инкретинового эффекта, что связано со снижением секреции ГПП-1 при сохранении чувствительности к нему тканей-мишеней. В тоже время сохраняется продукция ГИП и его

способность стимулировать секрецию глюкагона, однако нарушается его инсулинотропное действие, что и определяет меньшую заинтересованность в создании аналогов ГИП для лечения СД [Аметов А.С., 2011; Спасов А.А., 2015; Тюренков И.Н., 2015; Candeias E.M., 2015].

В практическую медицину внедрено два класса гипогликемических средств, влияющих на систему инкретинов: ингибиторы ДПП-4 (Ситаглиптин, Вилдаглиптин, Саксаглиптин, Линаглиптин, Алоглиптин, Госоглиптин) и синтетические аналоги ГПП-1 с режимом дозирования 2 раза в день (Эксенатид), 1 раз в день (Лираглутид, Ликсисенатид) и 1 раз в неделю (Эксенатид LAR, Албиглутид, Дулаглутид). Более десятка аналогов ГПП-1 и низкомолекулярных агонистов ГПП-1 рецептора (ГПП-1R) проходят клинические испытания в настоящее время. Основные направления при разработке новых аналогов ГПП-1 связаны с увеличением интервалов между инъекциями от 1 (Semaglutide, Glymera) до 2х или 4х недель (ITCA 650, Efgrenatide, VRS 859) и созданием пероральной формы для приема (NN9924, NN9926, NN9927, TTP054, TTP273, ZYOG1, ARI-1732TS). На стадии доклинических исследований находятся молекулы, обладающие агонистическим действием к нескольким инкретиновым рецепторам (к ГПП-1, ГПП-2, ГИП и др.) [Ленская К.В., 2011; Спасов А.А., 2015; Тюренков И.Н., 2015; Tomlinson B., 2015].

### **1.3.1. Плейотропные свойства средств с инкретиновой активностью**

Инкретины, обладая глюкозозависимым механизмом действия, способны устранять постпрандиальную гипергликемию. И ранее считалось, что позитивное действие инкретиномиметиков в отношении профилактики микро- и макрососудистых осложнений может быть связано именно с более строгим контролем гликемии, в том числе и с устранением постпрандиального скачка концентрации глюкозы в крови и предупреждением ее глюкозотоксичности. Однако, накопленные за последние 10 лет экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о целом ряде плейотропных эффектов присущих

инкретиномиметикам, которые расширяют их терапевтический потенциал. Основой для этого является широкое распространение рецептора к ГПП-1 (ГПП-1Р) в многих органах и тканях, а также его способность запускать важнейшие внутриклеточные сигнальные каскады, поддерживающие функциональную активность клетки и ингибирующие апоптоз в патологических условиях [Аметов А.С., 2014а; Власов Т.Д., 2016; Сухарева О.Ю., 2012].

Рецептор к ГПП-1 (ГПП-1Р) принадлежит к семейству связанных с G-белком рецепторов, который относится к классу В1 (секретин-подобное семейство). Взаимодействие ГПП-1 со своим рецептором сопровождается активацией аденилатциклазы (АЦ) с последующим повышением уровня цАМФ и активацией протеинкиназы А (РКА), а также фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) с последующей активацией протеинкиназы В (РКВ), посредством чего реализуется влияние ГПП-1 на функционирование клеток-мишеней, а также на процессы апоптоза и регенерации [Кайдашев И.П., 2012; Спасов А.А., 2015; Tate M., 2015].

В норме ГПП-1Р идентифицируется в поджелудочной железе, кишечнике, легких, жировой ткани, мышцах, почках, сердце, эндотелиальных, гладкомышечных клетках (ГМК), макрофагах и моноцитах, а также в нейронах и глиальных клетках [Arakawa M., 2010; Körner M., 2007; Saraiva F., 2014]. Мета-анализы клинических данных показали снижение риска возникновения и тяжести течения сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с СД 2 типа (инфаркта миокарда и инсульт) при применении инкретиномиметиков. Вероятно, именно это дало большой толчок к начавшемуся с 2009 года росту количества опубликованных исследований кардиопротекторных, эндотелиопротекторных, а также нейропротекторных свойств аналогов ГПП-1 и ингибиторов ДПП-4 при нейродегенеративных заболеваниях и ишемии головного мозга (ГМ) [Athauda D., 2016]. Исследования последних лет позволили частично объяснить механизмы позитивного действия

инкретиномиметиков на цереброваскулярную систему человека при СД 2 типа [Власов Т.Д., 2016; Аметов А.С., 2014а; Gumuslu E., 2016; Ma M., 2015].

### **Зоны экспрессии ГПП-1Р и ГПП-1 в головном мозге.**

ГПП-1 является не только энтероэндокринным гормоном, но и нейропептидом, поскольку секретируется в головном мозге в дорсальном комплексе блуждающего нерва (DVC), клетками ядра солитарного тракта и в малой группе нейронов, сосредоточенных в области А1 ретикулярной формации в продолговатом мозге. Было обнаружено, что ГПП-1 иммунореактивные волокна ядра солитарного тракта, сообщаются с гипоталамусом (с паравентрикулярным и дорсомедиальным ядрами, менее с дугообразным ядром) и субфорникальным органом. ГПП-1 иммунореактивные волокна выявлялись в таламусе и некоторых участках коры. В стволе ГМ данные волокна прилегают к ретикулярной формации и спинному мозгу [Sabou C., 2011].

Рецептор к ГПП-1 экспрессируется по всему мозгу с высокой плотностью в лобной коре, гипоталамусе, таламусе, гиппокампе, мозжечке и черной субстанции [Athauda D., 2016]. Эти регионы являются ключевыми в центральной регуляции энергетического гомеостаза и автономных функций. В гипоталамусе рецептор в основном распределен в следующих ядрах: дугообразное (связано с регуляцией аппетита), паравентрикулярное (выделяет окситоцин, который подавляет аппетит поступая в вентромедиальное ядро; соматостатин – замедляет моторику желудка), дорсомедиальное (регуляция АД и ЧСС) и супрахиазматическое (циркадные ритмы). Рецептор обнаружен в дорсальном комплексе блуждающего нерва, особенно в ядре солитарного тракта и в меньшем количестве в околожелудочковых зонах: субфорникальный орган и area postrema («самое заднее поле», «хеморецепторная зона» ствола мозга, ответственная за осуществление рвотного рефлекса) [Sabou C., 2011; Körner M., 2007]. В качестве нейропептида ГПП-1 может регулировать многие вегетативные и нейроэндокринные функции. В эксперименте и в клинике показано, что ГПП-1 ингибируя активность блуждающего нерва снижает

подвижность желудка, секрецию желудочных желез и панкреатического сока [Heppner K.M., 2015].

Таким образом, ГПП-1 как нейропептид участвует в функционировании оси “головной мозг – кишечник”. Он регулирует аппетит вследствие: (1) замедления моторики и опустошения желудка через угнетение блуждающего нерва и (2) формирования чувства насыщения, через взаимодействие с рецептором к ГПП-1 в ядрах гипоталамуса. Все это приводит к снижению аппетита, потребления пищи и снижению массы тела [Cabou C., 2011; Campbell J.E., 2013].

### **Исследования церебропротекторных свойств инкретиномиметиков при ишемии головного мозга**

Результаты ряда экспериментальных исследований нейропротекторного действия инкретиномиметиков показывают снижение размеров инфаркта ткани мозга и выраженности неврологического дефицита, а также ускорение восстановления пораженной ткани и когнитивных функций при лечебно-профилактическом введении препаратов с инкретиновой активностью [Симаненкова А.В., 2014; Darsalia V., 2014a,б; Gonçalves A., 2016; Ma M., 2015; Yang D., 2013].

Клинические исследования также показывают снижение риска сердечно-сосудистых осложнений СД 2 типа при добавлении аналогов ГПП-1 к стандартной терапии. Недавно были обнародованы результаты многоцентрового, международного, рандомизированного, двойного слепого, плацебо-контролируемого исследования LEADER (2010-2015), включающего 9340 участников с СД 2 типа, которые наблюдались в течение 3,5-5 лет с целью оценки влияния добавления к стандартной терапии лираглутида на возникновение кардиоваскулярной смерти либо нефатального инфаркта миокарда или инсульта. По результатам исследования при добавлении лираглутида к стандартной терапии количество участников с первым зафиксированным сердечно-сосудистым осложнением было на 12,4% меньше (608 из 4668), чем в группе со стандартной терапией (694 из 4672), количество

погибших от сердечно-сосудистых осложнений было ниже на 21,2% (219 из 4668), чем в группе со стандартной терапией (278 из 4672) [Marso S.P., 2016].

По результатам клинических исследований пока нет однозначного ответа на вопрос: оказывают ли ингибиторы ДПП-4 влияние на риск возникновения сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с СД 2 типа [Fisman E.Z., 2015; Green J.V., 2015]. При этом в литературе опубликованы экспериментальные работы, показывающие наличие эндотелио-, кардио- и нейропротекторных свойств у ингибиторов ДПП-4 [Оскола Е.В., 2013; Darsalia V., 2014; El-Sahar A.E., 2015; Ma M., 2015]. Однако потенциал использования ингибиторов ДПП-4 в терапии нарушений мозгового кровообращения окончательно не ясен и требует проведения дальнейших исследований.

Механизмы нейропротекторного действия аналогов ГПП-1 разнонаправлены и связаны не только с ингибированием апоптоза нейронов, снижением активации микроглии и воспаления, ускорением репаративных процессов и повышением нейрональной пластичности, но также и со снижением риска развития самого инсульта, что может быть обусловлено уменьшением эндотелиальной дисфункции, системного воспаления и прокоагулянтного потенциала крови [Аметов А.С., 2014; Власов Т.Д., 2016; Сухарева О.Ю., 2012].

### **1.3.2. Точки приложения действия инкретиномиметиков при нейродегенеративных и ишемических поражениях головного мозга**

#### **Нейровоспаление**

Хроническое воспаление в ткани головного мозга играет значительную роль в ее повреждении. Клетки микроглии, являясь макрофагами центральной нервной системы, при продолжительном воздействии провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  и TNF $\alpha$ ) и при гибели соседних нейронов, способны приобретать провоспалительный M1 фенотип. Макрофаги с фенотипом M1, продуцируя провоспалительные цитокины (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , STAT3, IL-6, IL-12, IL-23) способны защитить окружающую ткань от патогенов

и опухолевых клеток, что в данном случае может повлечь гибель окружающих нейронов. Напротив, противовоспалительный M2 фенотип стимулирует восстановление/ремоделирование ткани и ангиогенез посредством секреции противовоспалительных цитокинов (IL-10, IL-4 и IL-13) [Darsalia, V., 2014a; Shiraishi, D., 2012].

Способность аналогов ГПП-1 влиять на активность микроглии была показана во многих экспериментальных исследованиях, как на моделях нейродегенеративных заболеваний, так и при ишемически-реперфузионном повреждении нервной ткани. При этом применение инкретиномиметиков сопровождалось ингибированием активации микроглии [Cao L., 2016; McClean P.L., 2015] с преобладанием противовоспалительного M2 фенотипа [Darsalia V., 2014a], а также снижением экспрессии генов провоспалительных цитокинов (IL-1B, TNF $\alpha$  и MCP-1 – мощного фактора хемотаксиса моноцитов) [Gonçaves A., 2016].

Ключевым механизмом снижения нейровоспаления инкретиномиметиками считается реализация внутриклеточных сигнальных путей ГПП-1P/PI3K/PKA и ГПП-1P/PI3K/PKB, одной из конечных мишеней которых является транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B (Рис. 1), участвующий в регуляции экспрессии генов ряда провоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 и IL-8), молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1 и E-селектин) и реализующий активацию клеток микроглии. При этом стимуляция рецептора к ГПП-1 приводила к значительной супрессии NF- $\kappa$ B и последующего провоспалительного цитокинового каскада [Gonçaves A., 2016; Nassar N.N., 2015; Xu J., 2009].

### **Функциональное состояние митохондрий и апоптоз**

Функциональное состояние митохондрий – регуляторов клеточного энергетического гомеостаза имеет решающее значение для выживания клетки. При ишемически-реперфузионном поражении сбой в работе митохондрий является фатальным для клетки. При этом на этапе ишемии происходит нарушение функционирования переноса электронов между компонентами

дыхательной цепи, с последующим увеличением образования супероксидного радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ) и истощением антиоксидантной системы, и на этапе реперфузии наблюдается взрывной рост образования свободных радикалов, повреждение митохондрий и гибель клетки [Судаков Н. П., 2006].

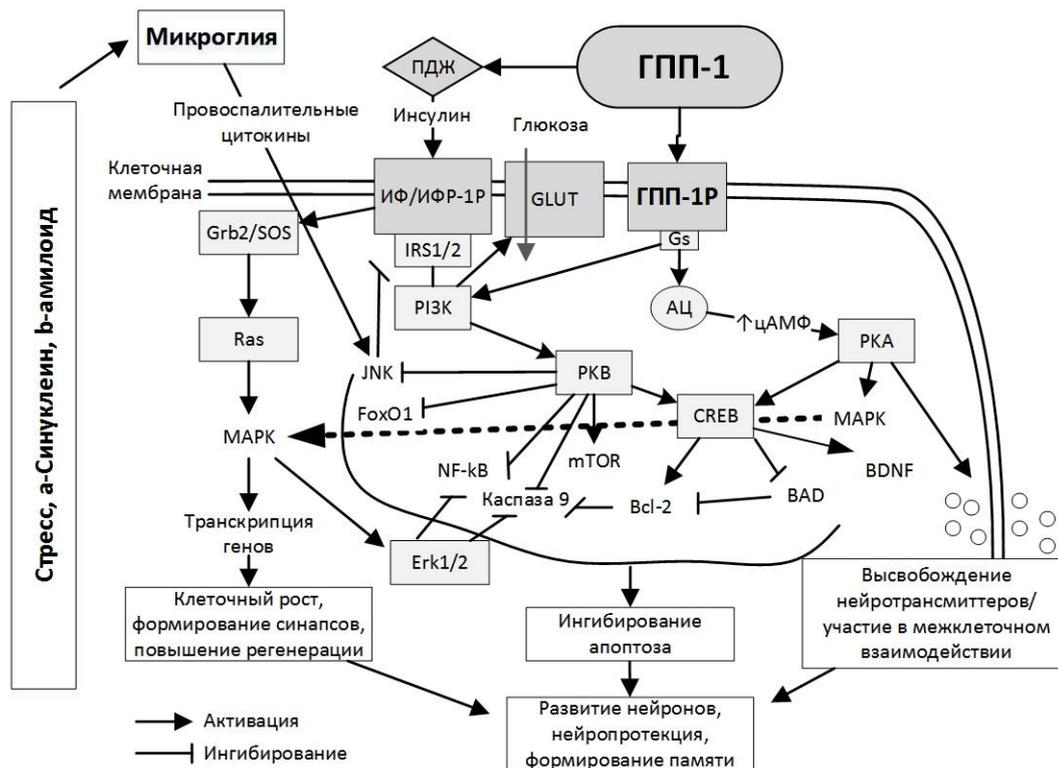
Инкретиномиметики в эксперименте проявили способность улучшать функциональное состояние митохондрий и ингибировать запуск процесса апоптоза по митохондриальному пути. Применение ингибиторов ДПП-4 и аналогов ГПП-1 показывало защитное действие в отношении митохондрий, повышая активность комплекса I дыхательной цепи и противоапоптотического белка Bcl-2 с последующим снижением активности каспазы 3, что в конечном итоге приводило к сохранению дофаминергических нейронов при моделировании болезни Паркинсона [Chen Y., 2015; Nassar N.N., 2015].

Механизм подобного эффекта связывают с активацией сигнальных путей ГПП-1Р/Р13К/РКВ и ГПП-1Р/АЦ/РКА:

- РКВ инактивирует транскрипционный фактор FOXO1 (Рис. 1), который при недостатке питательных веществ способен запустить процесс апоптоза, повышая транскрипцию генов про-апоптотических белков, регулирующих митохондриальные поры – BIM (Bcl-2-interacting mediator of cell death, взаимодействующий с Bcl-2-медиатор гибели клеток), PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis, p53-зависимый модулятор апоптоза).

- С другой стороны, рост внутриклеточного уровня цАМФ приводит к повышению соотношения Bcl-2/Bax, где Bcl-2 – противоапоптотический белок, ингибирующий транслокацию белка Bax (необходим для повышения проницаемости митохондриальной мембраны, для выхода цитохрома C и последующей активацией каспазы-3 и -9) (Рис. 1) [Zhan Y., 2012; Zhu H., 2016].

Вместе эти процессы способствуют поддержанию целостности внешней митохондриальной мембраны, сохранению мембранного потенциала и обеспечивают противоапоптотическое действие в условиях патологического состояния.



**Рис. 1. Возможные пути нейропротекторного действия ГПП-1 [Candeias E.M., 2015; Ferreira S.T., 2014; Wang W.Y., 2015].**

*Примечание: IP – инсулиновый рецептор; ИФР-1P – рецептор к инсулиноподобному фактору роста 1; ПДЖ – поджелудочная железа; BAD – белок активатор апоптоза; Bcl-2 – семейство белков, ингибирующих апоптоз; BDNF – нейротрофический фактор головного мозга. CREB – цАМФ-зависимый транскрипционный фактор; ERK – классические MAP-киназы, регулируемые внеклеточными сигналами; FOXO1 – транскрипционный фактор, участвующий в регуляции клеточного цикла; GLUT – белок-транспортер глюкозы; Gs – G-белок, стимулирующий аденилатциклазу (АЦ); IRS1/2 – субстраты инсулинового рецептора; JNK – c-Jun-NH2-терминальная протеинкиназа (Янус киназа); MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы; mTOR – серин/треониновая протеинкиназа, регулирующая рост, пролиферацию и выживание клеток; NF-κB – транскрипционный фактор «каппа-би», контролирующей экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; PKA – протеинкиназа А; PKB – протеинкиназа В.*

## **Эндотелиотропное действие инкретиномиметиков. Влияние на воспаление в сосудистой стенке, апоптоз эндотелиоцитов и пролиферацию ГМК**

Функция эндотелия реализуется посредством синтеза активных соединений обладающих вазодилатирующим, антитромботическим (экспрессия тромбомодулина и гепариноподобных сульфатированных гликозаминогликанов, продукция NO, простаглицина и тканевого активатора

плазминогена), противовоспалительным действием (подавление экспрессии молекул клеточной адгезии), а также регулирующих рост гладкомышечных клеток (секреция эндотелиального фактора роста и гепариноподобных ингибиторов роста). Эндотелиальная дисфункция характеризуется повышением уровня экспрессии молекул клеточной адгезии и синтеза провоспалительных факторов, что инициирует атерогенное поражение сосудов [Тюренков И.Н., 2012б, 2013а; Eriksson L., 2015].

Krasner и соавторы [Krasner N.M., 2014] показали, что лираглутид, активируя ГПП-1Р, дозозависимо активирует стресс-чувствительный фермент АМРК в эндотелиоцитах, который ингибирует активацию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, что является основой противовоспалительного действия ГПП-1. Фактор «каппа-би» необходим для транскрипции молекул адгезии (VCAM-1, ICAM-1 и E-селектина), которые стимулируют адгезию и инфильтрацию сосудистой стенки моноцитами и макрофагами, ассоциированы с эндотелиальной дисфункцией и атерогенезом [Oyama J., 2014]. При моделировании провоспалительной реакции в культуре эндотелиальных клеток с использованием TNF $\alpha$  и липополисахарида лираглутид снижал воспалительный ответ, снижая экспрессию молекул адгезии VCAM-1, ICAM-1 и E-селектина [Krasner N.M., 2014]. В похожем исследовании стимулированная TNF $\alpha$  продукция активных форм кислорода снижалась одновременно с повышением экспрессии антиоксидантных ферментов супероксид дисмутазы-1 и -2 [Oyama J., 2014].

Некоторые исследователи указывают на способность ГПП-1 вызывать приобретение тканевыми макрофагами противовоспалительного (M2) фенотипа, что может способствовать снижению воспаления в стенке сосуда и замедлению процесса формирования атеросклеротической бляшки [Shiraishi D., 2012]. Однако механизм подобного действия инкретиномиметиков полностью не изучен.

В условиях *in vitro* ГПП-1 ингибировал стимулированный конечными продуктами гликирования (КПГ) апоптоз эндотелиальных клеток, повышая

соотношение Vc1-2/Vaх, при этом внесение ГПП-1 в среду, где эндотелиоциты инкубировались с КПП приводило к снижению количества погибших клеток в результате апоптоза [Zhan Y., 2012].

В клинических исследованиях показано, что у пациентов, получавших лираглутид, наряду с метаболическими улучшениями наблюдалось снижение плазменной концентрации маркеров воспаления и атеросклеротического процесса, таких как высокочувствительный С-реактивный белок (снижение на 12-20%), ингибитор активатора плазминогена PAI-1 (снижение на 25-29%), а также многих про-воспалительных медиаторов, таких как TNF $\alpha$ , IL-6, toll-like рецептор-2 и 4 [Lorber D., 2013; Oyama J., 2014; Tate M., 2015].

Пролиферация и миграция ГМК из средней оболочки сосуда (media) в субэндотелиальное пространство играет важную роль в формировании утолщения интимы-медии и развитии стеноза. Эндотелий поддерживает баланс между ингибированием и стимуляцией пролиферации и миграции ГМК. Причиной повышенной пролиферации ГМК является наличие фактора роста тромбоцитов (PDGF), продуцируемого эндотелиоцитами и макрофагами в условиях гипергликемии, а также вследствие снижения выделения NO. В условиях *in vitro* эксендин-4 (природный аналог ГПП-1) снижал пролиферацию ГМК, стимулированную фактором роста тромбоцитов, а на модели сосудистого повреждения в условиях инсулинорезистентности *in vivo* снижал гиперплазию интимы [Goto H., 2011]. В ряде *in vitro* исследований предварительное добавление эксендина-4 в культуру ГМК замедляло стимулированную ангиотензином II пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток. В одном исследовании это связывали со способностью эксендина-4 снижать активность ERK1/2 и JNK [Nagayama K., 2015], в другом посредством снижения активности Rac1 (ГТФ-связывающий белок, передающий сигналы от ростовых факторов к актиновому цитоскелету, для обеспечения миграции клеток) через ГПП-1R/АЦ/РКА сигнальный путь.

Таким образом, применение инкретиномиметиков при лечении сахарного диабета позволяет снижать выраженность эндотелиальной дисфункции, и, как

следствие, может предупреждать снижение вазодилатирующей, антитромботической, противовоспалительной функции, а также снижать адгезию и инфильтрацию сосудистой стенки моноцитами и макрофагами (Рис. 2).

При изучении механизмов влияния инкретиномиметиков на функционирование эндотелия, многие исследователи отмечают существование связи рецептора к ГПП-1 с важнейшими внутриклеточными сигнальными каскадами в эндотелиоцитах: ГПП-1P/PI3K/PKB, ГПП-1P/АЦ/PKA/MAPK, ГПП-1P/PKB(MAPK)/NF-κB, при этом PKA и PKB) способны повышать активность eNOS (ГПП-1P/PKB(PKA)/eNOS) [Aronis K.N., 2013; Eriksson L., 2015; Lorber D., 2013; Oyama J., 2014].

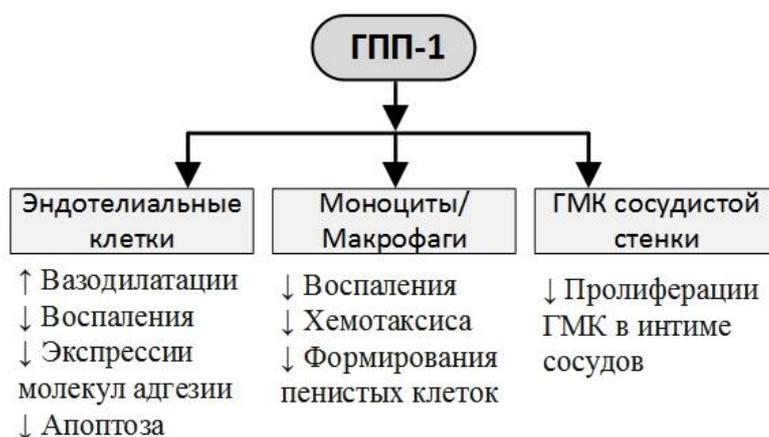


Рис. 2. Влияние ГПП-1 на стенку сосуда.

Примечание: ↑ – повышение; ↓ – снижение; ГМК – гладкомышечные клетки.

### Нейрогенез.

Уже долгое время не подвергаются сомнению свидетельства о наличии непрерывного процесса образования новых нейронов в головном мозге у взрослого человека. Клетки-предшественники благодаря микроокружению дифференцируются, интегрируются и образуют синаптические контакты. Нейрогенез важен при восстановлении после инсульта: миграция нейробластов к поврежденной области, дифференциация клеток и нейрональная пластичность имеют большое значение для нейрональной перестройки в месте поражения ГМ и для адаптации [Смирнов А.В., 2013].

Рецептор к ГПП-1 экспрессируется в гиппокампе и субвентрикулярной зоне, и многие исследователи пытаются изучить влияние ГПП-1 на нейрогенез. В условиях *in vitro* эксендин-4 стимулировал пролиферацию и нейрональную дифференциацию в культуре нейрональных клеток человека [Luciani, P., 2010]. Исследования по изучению влияния инкретиномиметиков на нейрогенез в условиях ишемии головного мозга показывают о умеренном стимулирующем влиянии аналогов ГПП-1 и ингибиторов ДПП-4 на нейрогенез при экспериментальной ишемии головного мозга в эксперименте [Darsalia V., 2012, 20146].

### **Нейротрофические факторы**

Трофические факторы способны замедлить процесс нейродегенерации, а также обладают нейропротекторным эффектом при восстановлении после ИИ. Однако нейротрофические факторы не способны преодолевать гематоэнцефалический барьер и требуют специфических путей введения (интраназальное, генно-инженерные методы). В отличие от нейротрофических факторов синтетические аналоги ГПП-1 могут вводиться парентерально и в настоящее время разрабатываются аналоги ГПП-1 в пероральной форме.

В ряде исследований было показано, что введение эксендина-4 и саксаглиптина вызывает повышение экспрессии нейротрофического фактора BDNF, известного своей способностью защищать дофаминергические нейроны, стимулировать дифференциацию клеток-предшественников и участвовать в формировании пространственной памяти [Gumuslu E., 2016; Nassar N.N., 2015]. Профилактическое введение аллоглиптина значительно повышало уровень BDNF в коре и переднем мозге экспериментальных животных, а при последующем моделировании фокальной ишемии уменьшало объем инфаркта и выраженность неврологического дефицита [Yang D., 2013]. Подобный трофический эффект инкретиномиметиков вероятно опосредован активацией сигнальных путей ГПП-1Р/Р13К/РКВ и ГПП-1Р/АЦ/цАМФ, которые активируют транскрипционный фактор CREB (сAMP response element-binding

protein), что в свою очередь повышает экспрессию BDNF (Рис. 1) [Gumuslu E., 2016; Sharma, M.K., 2014].

Применение инкретиномиметиков при сахарном диабете способно снизить риск сердечно-сосудистых осложнений основного заболевания, снизить размер некроза и ускорить восстановление функционально активной ткани мозга при развитии инсульта.

#### **1.4. Сенсоры жирных кислот и метаболизм глюкозы**

Десятилетие назад исследователи обратили внимание на группу специфических рецепторов, локализованных в основном на бета-клетках поджелудочной железы и энтероэндокринных клетках кишечника. Было обнаружено, что они способны активироваться жирными кислотами или их производными, а также некоторыми другими компонентами пищи. При стимуляции рецепторов наблюдалось повышение секреции инкретинов, инсулина и некоторые другие эффекты, связанные с регуляцией углеводного обмена [Спасов А.А., 2015; Тюренков И.Н., 2015; Ohishi T., 2012; Zhang D., 2014].

Данные рецепторы экспрессируются на энтероэндокринных клетках (GPR40, GPR43, GPR119 и GPR120) и островках Лангерганса (GPR40, GPR43 и GPR119), макрофагах (GPR120), нейтрофилах и моноцитах (GPR43), а также адипоцитах (GPR120). Их стимуляция приводит к повышению синтеза инкретинов (GPR40, GPR43, GPR119 и GPR120), выработки инсулина (GPR40 и GPR119) [Watterson K.R., 2014] и лептина (GPR43) [Ge H., 2008]. Так же при активации некоторых из них отмечается повышение захвата глюкозы адипоцитами и противовоспалительное действие (GPR120) [Zhang D., 2014], снижается липолитическая активность в жировой ткани и плазменный уровень свободных жирных кислот (GPR43) [Ge H., 2008]. Особое внимание привлекает рецептор GPR119 экспрессирующийся на энтероэндокринных клетках и бета-клетках поджелудочной железы, как перспективная фармакологическая мишень

для разработки перорального гипогликемического препарата [Спасов А.А., 2015; Тюренков И.Н., 2015].

#### **1.4.1. Рецептор GPR119. Строение. Функции. Механизм активации**

Рецептор GPR119 был открыт в 1999 году в рамках Проекта Геном Человека [Fredriksson R., 2003]. Данный рецептор принадлежит к классу А (родопсин подобных) рецепторов, сопряженных с G-белком и представляет собой 7 трансмембранных доменов из 335 аминокислот с суммарной молекулярной массой 36,889 кДа. Ген, кодирующий рецептор GPR119 локализован в коротком плече X-хромосомы (Xp26.1) и состоит из одного экзона (ENST00000276218) без интронов. Гомологи рецептора найдены у многих позвоночных животных включая крыс, мышей, хомяков, шимпанзе, приматов, собак и свиней [Fredriksson R., 2003; Takeda S., 2002]. При секвенировании было обнаружено гомологическое сходство рецептора GPR119 с аденозиновыми (A1, A2) и каннабиоидными рецепторами [Costanzi S., 2008]. При изучении экспрессии мРНК рецептора GPR119 у людей он был выявлен в поджелудочной железе, кишечнике и печени новорожденных [Chu Z.L., 2007; Overton H.A., 2006, 2008].

##### **Физиологические функции GPR119**

Наличие экспрессии GPR119 на бета-клетках островков поджелудочной железы и энтероэндокринных L- и K-клетках кишечника, свидетельствует о причастности рецептора GPR119 к регуляции углеводного обмена. Введение агониста GPR119 усиливало глюкозостимулированную секрецию инкретинов и инсулина [Soga T., 2005]. Многими авторами отмечена способность агонистов GPR119 повышать количество пролиферирующих инсулин позитивных клеток у животных с экспериментальным СД 2 типа [Yoshida S., 2011].

##### **Активация рецептора GPR119**

Рецептор GPR119 ассоциирован с Gas, и вызывает активацию аденилатциклазы с последующим повышением содержания цАМФ в клетке. Агонисты рецептора GPR119 значительно повышают уровень ГПП-1 в плазме у

мышей до проведения глюкозной нагрузки, не влияя при этом на секрецию инсулина. При пероральной глюкозной нагрузке, агонисты GPR119 повышали синтез и секрецию инсулина [Lan H., 2012]. Антагонист рецептора ГПП-1 примерно вдвое снижал способность агониста GPR119 стимулировать секрецию инсулина *in vivo*. На этом основании некоторые авторы считают, что гипогликемический эффект агонистов рецептора GPR119, на 50%, обусловлен действием на L-клетки кишечника, и на 50% действием на бета-клетки поджелудочной железы и K-клетки кишечника [Lauffer L., 2008]. Таким образом, при исследованиях *in vitro* и *in vivo* был подтвержден двойной механизм действия агонистов GPR119, заключающийся в стимуляции секреции инкретинов и стимуляции секреции инсулина при глюкозной нагрузке [Watterson K.R., 2014].

#### **1.4.2. Агонисты рецептора GPR119, как новая группа сахароснижающих средств**

В первых *in vivo* исследованиях отмечалось, что агонисты рецептора GPR119 при пероральном введении имеют значительный стимулирующий эффект на секрецию инсулина. Так, первый синтетический агонист GPR119 соединение AR231453 значительно увеличивало уровень инсулина в бета-клетках линий HEK293, HIT-T15 и RIN-5F, а также уровень ГПП-1 в L-клетках линии GLUTag. В отличие от глибенкламида агонист GPR119 (AR231453) в высоких дозах (100 мг/кг) не вызывал гипогликемии. При этом он сопоставимо с глибенкламидом снижало толерантность к глюкозе [Chu Z.L., 2007]. В исследованиях на нокаутных животных (GPR119<sup>-/-</sup>) описанные выше эффекты не наблюдались [Gao J., 2011].

Курсовое введение агониста рецептора GPR119 соединения AS1535907 мышам склонным к ожирению (линия LepRdb/db), вызывало увеличение выработки инсулина и увеличение площади островков Лангерганса по сравнению с контрольной группой [Yoshida S., 2011]. При этом наблюдалось увеличение экспрессии транскрипционных факторов бета-клеток в

поджелудочной железе (Nkx 2,2; Nkx 6,1; NeuroD и др.), которые необходимы для дифференциации эндокринных клеток поджелудочной железы [Yoshida S., 2011], а также ответственных за синтез прогормон–превращающего фермента 1, который в свою очередь регулирует биосинтез инсулина. Эти результаты показывают, что соединение агонист рецептора GPR119, соединение AS1535907 потенциально способно регулировать секрецию инсулина и оказывать протекторное действие на функцию бета-клеток за счет регуляции факторов транскрипции [Yoshida S., 2011].

Клинические исследования (КИ) агонистов рецептора GPR119 начались в 2008 году и продолжаются по настоящее время. Около 50 наиболее активных молекул прошли доклинические исследования и на данный момент 5 агонистов GPR119 дошли до 1-й и 5 агонистов до 2-й фазы КИ [Тюренков И.Н., 2015; Спасов А.А., 2015; Ritter K., 2016].

По данным имеющихся результатов клинических исследований, агонисты рецептора GPR119 обладают хорошей переносимостью и безопасны при длительном применении. Препараты MBX-2982, GSK-1292263, PSN-821 и APD597 [Kang S.U., 2013] на начальных этапах КИ при введении пациентам с СД 2 типа оказывали умеренное гипогликемическое действие, однако при анализе итоговых результатов некоторыми исследователями их эффективность была оценена как недостаточная. Результаты КИ других агонистов GPR119 еще не обнародованы, исследования продолжаются. Возможно расширение базы клинических исследований представленных и новых агонистов GPR119 позволят дать окончательный ответ относительно перспектив данного фармакотерапевтического подхода при лечении СД 2 типа.

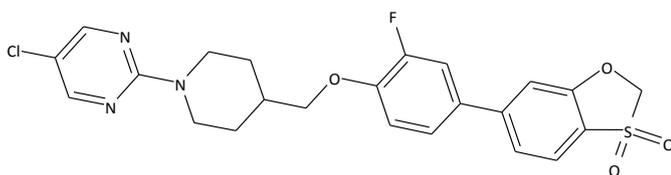
#### **1.4.3. Перспективы использования агонистов рецептора GPR119 в качестве церебропротекторов при нарушениях мозгового кровообращения на фоне сахарного диабета**

На основании представленных данных можно отметить, что агонисты рецептора GPR119 обладают рядом неоспоримых преимуществ, к которым

относятся выраженное гипогликемическое действие после приема пищи и отсутствие при их применении гипогликемических состояний. К положительным свойствам агонистов GPR119 надо отнести их двойной механизм действия, заключающийся в стимулировании секреции инкретинов (ГПП-1 и ГИП) и инсулина (при поступлении глюкозы). Учитывая широкое представление рецептора к ГПП-1 в разных тканях (сердце, сосуды, головной мозг), нельзя исключать, что повышение уровня ГПП-1 при активации рецептора GPR119 может вызвать ряд эффектов, не связанных с регуляцией уровня гликемии: защитное действие на нейроны и эндотелиоциты в условиях ишемии ГМ.

В настоящее время еще нет опубликованных работ по изучению влияния агонистов GPR119 на течение и исход ишемического поражения ГМ. Но поскольку соединения данной группы позиционируются как пероральные гипогликемические препараты для длительного применения у больных СД 2 типа, которые имеют высокий риск развития нарушения мозгового кровообращения (НМК), представляется целесообразным изучить влияние агонистов GPR119 на течение ишемического инсульта в эксперименте.

В лаборатории органического синтеза Исследовательского Института Химического Разнообразия (АО «ИИХР», г. Химки, РФ) было синтезировано соединение 5-хлор-2-(4-{[4-(3,3-диоксидо-1,3-бензоксатиол-6-ил)-2-фторфенокси]метил}пиперидин-1-ил)пиримидин<sup>1</sup> (Рис. 3), которому присвоили шифр ZB-16.



**Рис. 3. Химическая структура агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16.**

<sup>1</sup> Выражаем глубокую благодарность начальнику отдела медицинской химии АО «Исследовательского Института Химического Разнообразия» Шадееву Михаилу Айратовичу за предоставление субстанции вещества для данной работы.

Для данного соединения в условиях *in vitro* с использованием линии клеток CHO-K1 были определены специфическая активность в отношении человеческого рецептора GPR119 (hGPR119). Данное соединение посредством активации рецептора hGPR119 было способно повышать внутриклеточный уровень цАМФ в наномолярных концентрациях ( $EC_{50} M = 7.25E-09$ ) [Chafeev M.A., 2015].

Для данного соединения ранее было установлено наличие гипогликемического действия на интактных крысах (однократное введение), однако на данный момент не было известно, способны ли агонисты рецептора GPR119 и, в частности, соединение ZB-16, влиять на течение и исход ишемического поражения головного мозга на фоне СД 2 типа.

## ГЛАВА 2. Материалы и методы

### 2.1. Экспериментальные животные

Исследование выполнено на 354 крысах-самцах линии Wistar, возраст – 7-8 месяцев, масса – 330-360 г. (ФГУП «Питомник лабораторных животных «РАППОЛОВО», д. Рапполово, Всеволожский р-н, Ленинградская обл., Россия). Животные содержались в полипропиленовых клетках (545x395x200 мм, Тип: Т/4В, ООО «МЭСТ», г. Москва) на подстиле из стружек мягких пород дерева, по 8-10 особей со свободным доступом к воде и гранулированному корму (ГОСТ Р 51849-2001, ООО «Лабораторкорм», Москва, Россия) в стандартных условиях вивария с 12ч/12ч свето/темновым циклом, температурой воздуха  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  и влажностью 40-60%. Экспериментальные группы формировались по истечению карантинного периода (2 недели) с использованием случайного распределения по группам. Исследовательские манипуляции выполняли в один и тот же период суток для сведения к минимуму влияния суточных биоритмов на результаты.

Эксперименты проводились в соответствии с Приказом МЗ и СР РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики», с ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», с ГОСТ Р 51000.4-2011 «Общие требования к аккредитации испытательных лабораторий», с соблюдением Международных рекомендаций «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986) и были одобрены Региональным Независимым Этическим Комитетом (ГУ Волгоградский Медицинский Научный Центр) (регистрационный номер IRB 00005839 IORG 0004900 (OHRP)): протокол № 191-2014 от 25 февраля 2014. Хирургические процедуры и эвтаназия животных при выведении из эксперимента выполнялись с использованием хлоралгидрата в дозе 400 мг/кг (внутрибрюшинно).

## 2.2. Исследуемое соединение и препараты сравнения

### Исследуемое соединение

Исследуемое соединение 5-хлор-2-(4-{[4-(3,3-диоксидо-1,3-бензоксатиол-6-ил)-2-фторфенокси]метил}пиперидин-1-ил)пиримидин под лабораторным шифром ZB-16 (дипиарон) (Рис. 3) было синтезировано в АО «ИИХР» (г. Химки, РФ) и представляет собой высокоселективный агонист рецептора GPR119 ( $EC_{50} M = 7.25E-09$ ) [Chafeev M.A., 2015]. По результатам ряда проведенных исследований, соединение ZB-16 не проявляет мутагенной активности *in vitro* (штаммы *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 и TA1537, в концентрациях от 0,00625 до 0,2 мг/мл) [Колобродова Н.А., 2015], обладает низкой клеточной токсичностью (в диапазоне концентраций от  $10^{-9}$  до  $10^{-4}M$ , линия клеток HepG2) и малой токсичностью по классификации И. В. Саноцкого [Саноцкий И.В., 1970].

### Препараты сравнения.

Для исследования терапевтического потенциала агонистов GPR119 при ишемии ГМ на фоне СД нам необходимо было выбрать наиболее приемлемые препараты сравнения в условиях, когда препараты с аналогичным механизмом действия еще не вышли на рынок.

Первым препаратом сравнения был взят метформин (400 мг/кг, *per os*) [Ismail T.A., 2015], как золотой стандарт в лечении сахарного диабета 2 типа с высокой эффективностью.

Вторым препаратом сравнения был выбран препарат из группы ингибиторов ДПП-4. На наш взгляд, ингибиторы ДПП-4 (фермента, ответственного за физиологическое расщепление инкретинов) – наиболее близкая по механизму действия группа препаратов. Ингибиторы ДПП-4 повышают плазменную концентрацию двух основных гормонов семейства инкретинов: ГПП-1 и ГИП, замедляя их разрушение. Тогда как агонисты GPR119 помимо глюкозозависимой повышения секреции инсулина, стимулирует секрецию эндогенных ГПП-1 и ГИП, повышая их плазменную

концентрацию. Обе группы имеют пероральную форму для приема. Однако различие фармакологических мишеней не дает утверждать, что динамика изменений плазменного уровня инкретинов в течение суток будет идентичной, поскольку при СД наблюдается снижение секреции эндогенных инкретинов.

В качестве второго препарата сравнения был выбран госоглиптин (АО «ИИХР», г. Химки, РФ) – отечественный ингибитор ДПП-4, который в настоящее время проходит III фазу клинических испытаний и по результатам сравнительного исследования не уступает вилдаглиптину по способности снижать уровень HbA1c [Галстян К.О., 2016; Недосугова Л.В., 2014]. В условиях *in vitro* по активности госоглиптин ( $IC_{50}=11,3$  нМ) превышает большинство применяемых ингибиторов ДПП-4: ситаглиптин ( $IC_{50}=19$  нМ), вилдаглиптин ( $IC_{50}=62$  нМ), саксаглиптин ( $IC_{50}=50$  нМ) и алоглиптин ( $IC_{50}=24$  нМ) [Thomas L., 2008]. По результатам ряда клинических исследований госоглиптин обладает высокой селективностью к дипептидилпептидазе 4 типа и достаточно хорошими фармакокинетическими параметрами:  $T_{max}$  от 0,5 до 1,5 ч,  $T_{1/2}$  от 15 до 27 ч, ингибирование ДПП-4 в течение 24 ч после введения составляет более 80%, сопровождавшееся двукратным подъемом ГПП-1 [Недосугова Л.В., 2014; Muto C., 2012].

Госоглиптин в нашем исследовании вводился перорально в дозе 5 мг/кг [Sharma R., 2012].

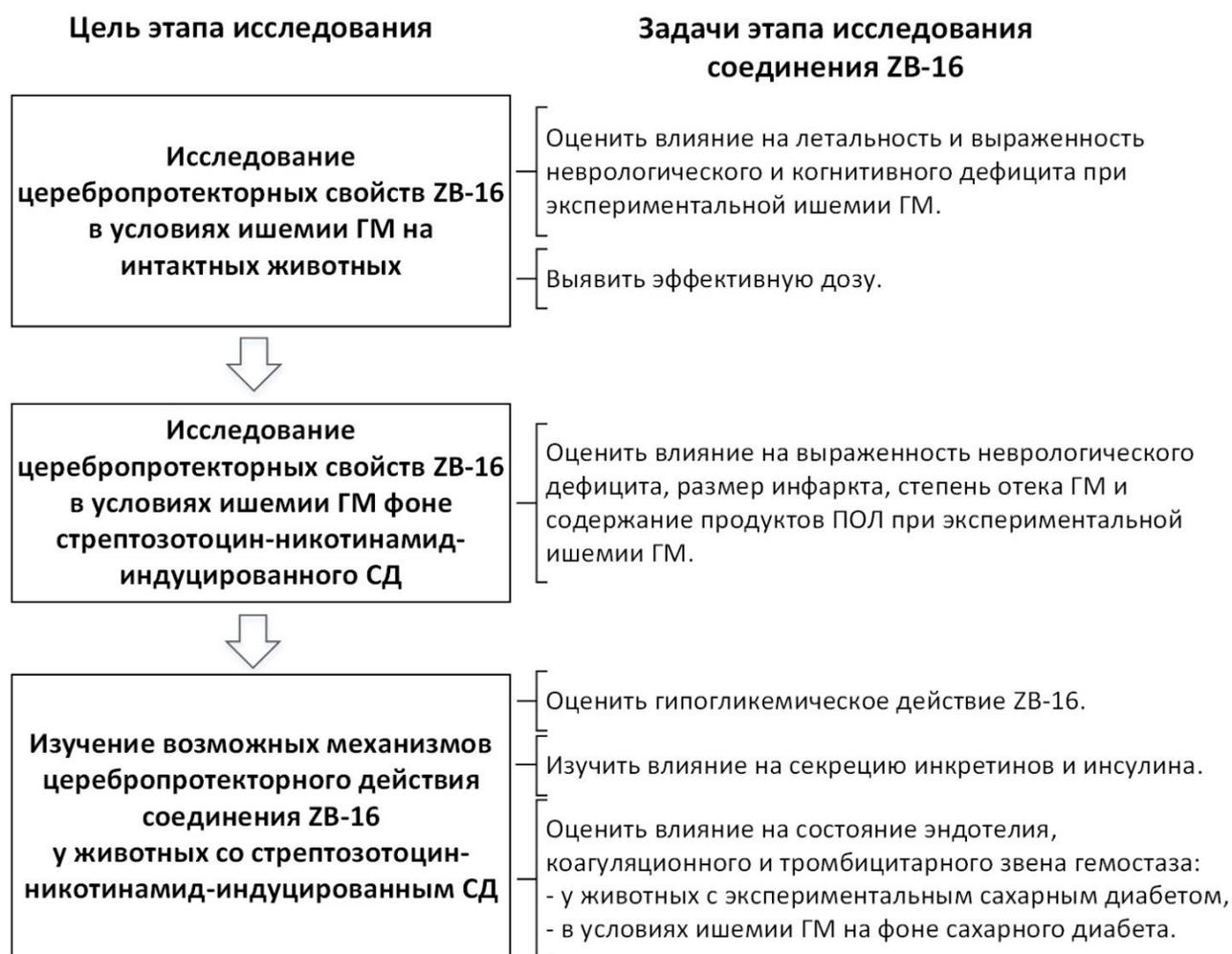
Поскольку целью исследования было изучение церебропротекторного действия препарата при НМК на фоне СД, и моделировалась сочетанная патология (Рис. 6.) еще одним препаратом сравнения стал нейропротектор цитиколин (Ferrer Internacional, Испания) в дозе 500 мг/кг (*per os*), который широко используется во всем мире для вторичной нейропротекции при НМК различного генеза.

### 2.3. Дизайн исследования

На первом этапе исследования мы изучили церебропротекторное действие агониста рецептора GPR119 на интактных животных с выбором

наиболее активной дозы. В качестве модели ишемического повреждения ГМ использовалась билатеральная окклюзия общих сонных артерий, оценивалась летальность и выраженность неврологического и когнитивного дефицита.

На втором этапе мы оценили влияние курсового введения соединения ZB-16 животным со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД на выраженность психоневрологического дефицита после моделирования фокальной ишемии ГМ. Оценивались размер инфаркта, выраженность неврологического дефицита, функциональное состояние эндотелия, параметры плазменного и тромбоцитарного звена гемостаза, и содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

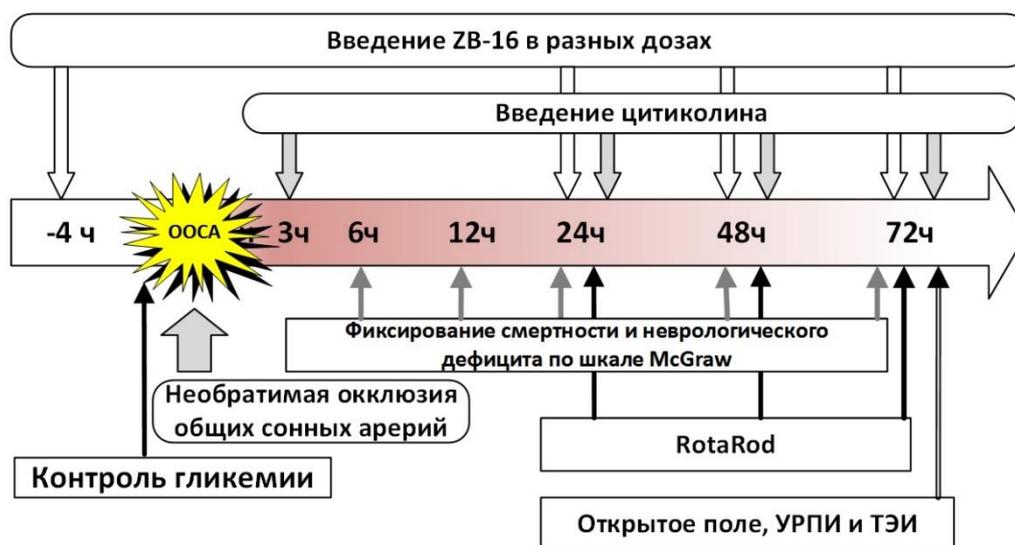


**Рис. 4. Дизайн экспериментального изучения церебропротекторного действия агониста рецептора GPR119 при экспериментальной ишемии головного мозга на фоне сахарного диабета**

Исследуемое соединение позиционируется как пероральный сахароснижающий препарат с инкретиновой активностью для длительного применения при СД 2 типа. Поэтому на этапе изучения механизмов церебропротекторного действия мы оценили гипогликемическое действие исследуемого соединения при курсовом введении в разных дозах на модели стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД (Рис. 4), а также его влияние на секрецию ГПП-1 и инсулина при глюкозной нагрузке у животных с диабетом и интактных крысах. У животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, после курсового введения ZB-16 также оценивались параметры плазменного и тромбоцитарного звена гемостаза, а также функциональное состояние эндотелия.

### ***2.3.1. Исследование церебропротекторного потенциала ZB-16 в разных дозах при моделировании окклюзии общих сонных артерий у интактных животных***

По литературным данным большинство агонистов рецептора GPR119 в эксперименте проявляют выраженную активность *in vivo* в диапазоне доз от 1 до 25 мг/кг (*per os*) [Ritter K., 2016]. По предварительным исследованиям ZB-16 уже в дозе 1 мг/кг проявляет максимальный гипогликемический эффект, который очевидно реализуется за счет стимуляции секреции инкретинов. Церебропротекторный потенциал агонистов GPR119, как мы предполагаем будет также иметь инкретинопосредованную природу. Однако нам необходимо выявить наиболее эффективную дозу соединения ZB-16, в котором оно будет оказывать наиболее выраженное церебропротекторное действие в условиях окклюзии общих сонных артерий (ООСА). Поэтому на данном этапе диапазон доз был расширен в сторону увеличения: 1, 10 и 25 мг/кг (*per os*). Дизайн этапа исследования представлен на Рис. 5.



**Рис. 5** Дизайн исследования церебропротекторного потенциала ZB-16 в разных дозах при перевязке общих сонных артерий у интактных животных

Примечание: ООСА – окклюзия общих сонных артерий.

Экспериментальные группы (n=12):

1. ЛО<sup>2</sup> + физ.р-р
2. ООСА<sup>3</sup> + физ.р-р (Контроль)
3. ООСА + ZB-16 (1 мг/кг)
4. ООСА + ZB-16 (10 мг/кг)
5. ООСА + ZB-16 (25 мг/кг)
6. ООСА + Цитиколин (500 мг/кг)

### 2.3.2. Исследование церебропротекторного действия ZB-16 при моделировании фокальной ишемии ГМ на фоне сахарного диабета

На данном этапе исследования животные со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД получали сахароснижающую терапию на протяжении 28 дней, после чего им моделировали внутрисосудистую фокальную ишемию головного мозга (интравазальная окклюзия средней мозговой артерии на 30 минут). Препарат сравнения цитиколин начинали вводить через 3 часа после моделирования ишемии (Рис. 6).

<sup>2</sup> ЛО – ложно-оперированные животные;

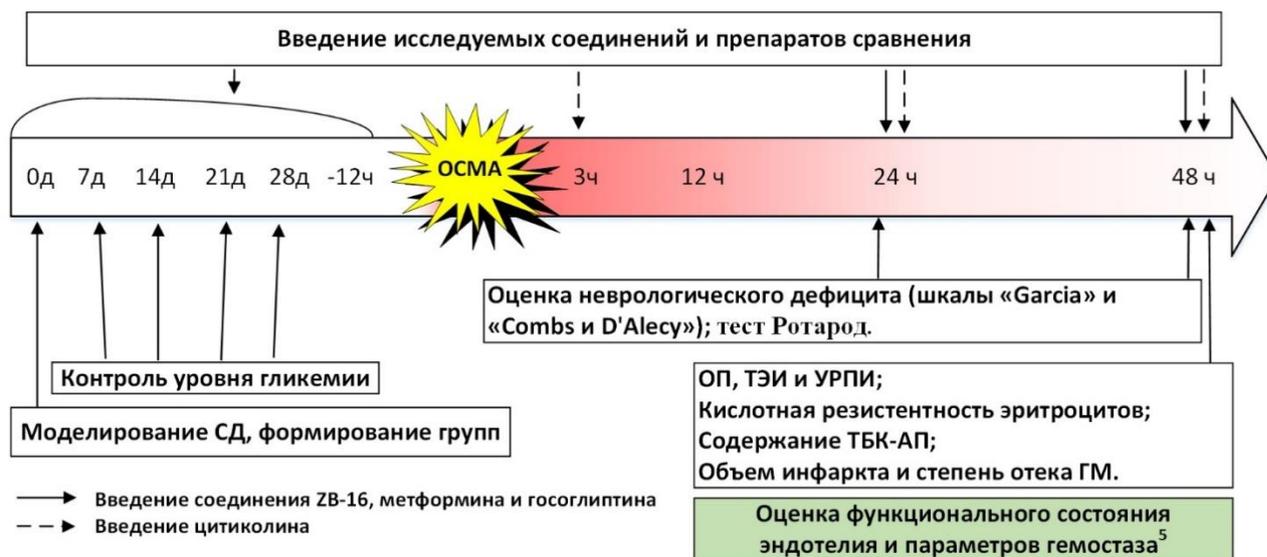
<sup>3</sup> ООСА – окклюзия общих сонных артерий.

Для исследования церебропротекторного действия ZB-16 при окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) на фоне сахарного диабета мы посчитали целесообразным сформировать следующие группы (n=13) (Таблица 1):

**Таблица 1. Экспериментальные группы животных при исследовании церебропротекторного действия ZB-16 при окклюзии средней мозговой артерии на фоне сахарного диабета**

	№	Патология	Лечение	Длительность лечения
Интакт	1	ЛО (Интакт)	0.9%NaCl	30 дней (профил.+лечеб.)
	2	ОСМА+СД	0.9%NaCl (Контроль)	30 дней (профил.+лечеб.)
Сахарный диабет	3	ОСМА+СД	ZB-16	30 дней (профил.+лечеб.)
	4	ОСМА+СД	Метформин	30 дней (профил.+лечеб.)
	5	ОСМА+СД	Госоглиптин	30 дней (профил.+лечеб.)
	6	ОСМА+СД	Цитиколин <sup>4</sup>	2 дня (лечеб.)

Примечание: ЛО – ложно-оперированные интактные животные; ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии.



**Рис. 6. Дизайн исследования церебропротекторного действия ZB-16 при фокальной ишемии ГМ на фоне сахарного диабета<sup>5</sup>**

Примечание: ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии; в качестве модели сахарного диабета использовался стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный СД.

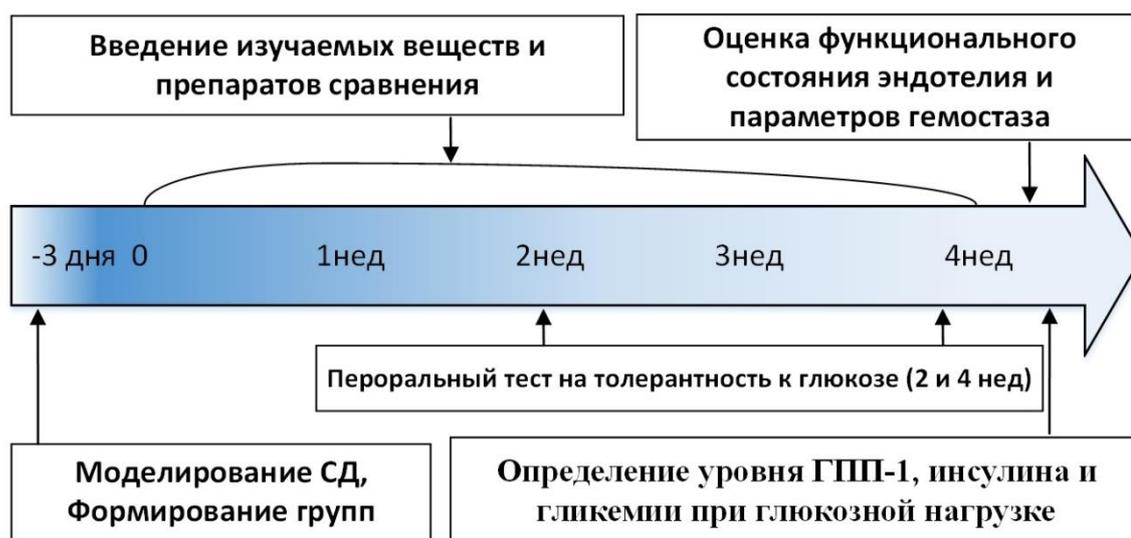
<sup>4</sup> Цитиколин вводили через 3 часа после моделирования НМК и далее 1 раз в сутки

<sup>5</sup> Результаты оценки функционального состояния эндотелия и параметров гемостаза представлены в главе 5.3. (стр.105)

### 2.3.3. Исследование механизмов церебропротекторного действия соединения ZB-16

Эффективная гипогликемическая терапия имеет важное значение, как для снижения риска развития сердечно-сосудистых осложнений СД (улучшение функционального состояния эндотелия и уменьшение прокоагулянтного сдвига в системе гемостаза), так и для снижения тяжести течения ишемического инсульта [Гудкова В.В., 2015; Kishore P., 2012].

Как известно, инкретины, помимо повышения уровня инсулина и последующего гипогликемического действия, способны оказывать эндотелиопротекторное действие при гипергликемии, а также нейропротекторное действие в условиях ишемии ГМ. На данном этапе исследования мы оценили выраженность гипогликемического действие соединения ZB-16 (0,1, 1 и 10 мг/кг, per os), а также его влияние на секрецию инкретинов и состояние тромбоцитарного и плазменного компонентов гемостаза у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД после 28 дней введения исследуемого соединения. Дизайн этапа исследования представлен на Рис. 7.



**Рис. 7. Дизайн исследования гипогликемических свойств ZB-16 на модели стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД**

*Примечание: ПТТГ – пероральный тест на толерантность к глюкозе; в качестве модели сахарного диабета использовался стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный СД.*

Группы животных при исследовании гипогликемических свойств ZB-16 на модели стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД (n=12):

1. Интакт + физ.р-р
2. СД + физ.р-р (Контроль)
3. СД + ZB-16 (0,1 мг/кг)
4. СД + ZB-16 (1 мг/кг)
5. СД + ZB-16 (10 мг/кг)
6. СД + Метформин (400 мг/кг)
7. СД + Госоглиптин (5 мг/кг)

#### **2.4. Моделирование стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД**

В качестве модели сахарного диабета использовали стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный СД, который вызывали путем однократного внутрибрюшинного введения стрептозотоцина (65 мг/кг, Sigma-Aldrich, США) через 15 минут после предварительного введения никотинамида (230 мг/кг) [Мазо В.К., 2016; Спасов А.А., 2011; Masiello P., 1998]. Предварительно, за 12 часов (на ночь) животные лишались пищи со свободным доступом к воде. Стрептозотоцин разводили холодным цитратным буфером (1мМ, рН 4.5) в темной таре, для разведения никотинамида использовали раствор NaCl (0,9%).

Такая комбинация позволяет воспроизводить состояние в значительной степени близкое к СД 2 типа, проявляющееся в умеренной и стабильной гипергликемии, нарушении толерантности к глюкозе и появлении глюкозурии. Данная модель близка к патологическому состоянию, которое характеризуется частичной потерей бета-клеточной массы [Спасов А.А., 2011; Masiello P., 1998] и может соответствовать клинической форме СД 2 типа, поскольку по последнему определению СД 2 типа это «нарушение углеводного обмена, вызванное преимущественной инсулинорезистентностью и относительной инсулиновой недостаточностью или преимущественным нарушением секреции инсулина с инсулинорезистентностью или без нее» [Дедов И.И., 2015a].

Спустя 72 часа после введения стрептозотоцина измеряли уровень гликемии и для эксперимента отбирали животных с уровнем гликемии после 6-ти часовой пищевой депривации в пределах 8-16 ммоль/л. Далее животных распределяли по группам в соответствии с принципом рандомизации.

#### ***2.4.1. Оценка гипогликемической активности исследуемых соединений***

**Методика измерения уровня гликемии.** Измерение уровня глюкозы в крови проводили после 6 часовой пищевой депривации. Для измерения использовали кровь из хвостовой вены. Уровень глюкозы определяли в крови глюкозооксидазным методом [Камышников В.С., 2009] с измерением величины оптической плотности надосадочной жидкости в кюветах с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 500 нм на спектрофотометре ПЭ-5400В (ЗАО «НПО Экрос», Россия) с использованием наборов «Глюкоза ФКД» (Россия).

#### **Проведение перорального теста на толерантность к глюкозе**

Пероральный тест на толерантность к глюкозе проводили (после 6 часовой пищевой депривации) путем однократного перорального введения 40% раствора глюкозы (3 г/кг, «глюкозная нагрузка») с предварительным и последующим определением концентрации глюкозы в крови спустя 30, 60 и 120 мин [Спасов А.А., 2012]. После построения графиков «уровень гликемии-время» рассчитывали площади под кривой в программе Prism 5.

#### ***2.4.2. Определение уровня инсулина и ГПП-1 в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа***

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили с использованием фотометра-анализатора SUNRISE («TECAN», Австрия), микропланшетного вошера HydroFlex M8/2 («TECAN», Австрия) и термошейкера для планшетов PST-60HL (BioSan, Рига, Латвия). Для получения сыворотки у животных посредством пункции подъязычной вены забирали по 1 мл крови в пробирки типа Эппендорф и оставляли ее на 2 часа при  $t=25^{\circ}\text{C}$ . Спустя 2 часа после обведения сгустка крови стерильной стеклянной палочкой центрифугировали

при 3000 об/мин 15 мин на центрифуге CM-50 (Elmi, Рига, Латвия) и отбирали сыворотку в микроцентрифужные пробирки.

Количественное определение инсулина и ГПП-1 в образцах сыворотки определяли 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.

Для работы с калибровочными кривыми и расчета содержания иммунореактивного материала в опытных образцах использовалось программное обеспечение CurveExpert 1.3 (Daniel Hyams, USA) и Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, США).

## **2.5. Моделирование ишемического повреждения головного мозга**

### ***2.5.1. Выполнение необратимой двусторонней перевязки общих сонных артерий***

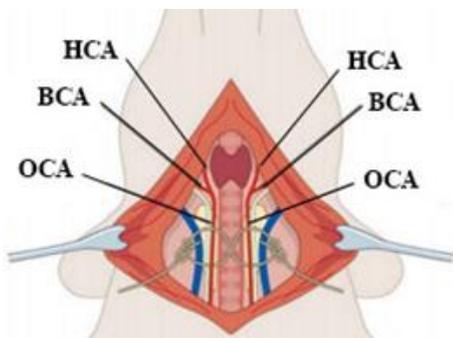
Операционные процедуры проводятся с использованием наркоза (хлоралгидрат в дозе 400 мг/кг (внутрибрюшинно)).

**Подготовка операционного поля.** Животное фиксируется (узким скотчем) за лапы на спине на хирургическом столе. Волосяной покров с передней части шеи удаляется депиляционным кремом от нижней челюсти до грудины. Поверхность кожи обрабатывается спиртом (70%).

**Оперативный доступ к общим сонным артериям.** Отступив 0,5 см от грудины выполняется продольный разрез по срединной линии шеи длиной 2 см. Подкожно жировой слой разрезается сосудистыми ножницами, края раны разводятся в стороны с использованием зажимов. Под грудино-ключично-сосцевидной мышцей, ближе к грудине находится сосудисто-нервный пучок, который необходимо оросить раствором лидокаина (2%). Выделение общей сонной артерии производится без прикосновения к блуждающему нерву. В качестве лигатуры используется нерассасывающийся шовный материал. Завязывается узел и затягивается, не захватывая окружающие ткани (Рис. 8).

После проверки правильного положения узла затягивается второй узел, шовный материал на 2мм выше узла обрезается. Аналогичная выполняется на другой общей сонной артерии. Операционное поле обрабатывается раствором хлоргексидина 0,05%. Операционная рана зашивается кисетным швом. Шов обрабатывается раствором йода.

**Постоперационное наблюдение.** После операции животные помещаются в большие клетки с чистыми опилками по 5-6 особей. На пол клетки в чашке Петри помещается увлажненный корм. Спустя 6, 12, 24, 48 и 72 часа животные находятся под наблюдением, фиксируется летальность и неврологический дефицит.



**Рис. 8. Окклюзия общих сонных артерий [Тюренокв И.Н., 2013б; Farkas E., 2007].**

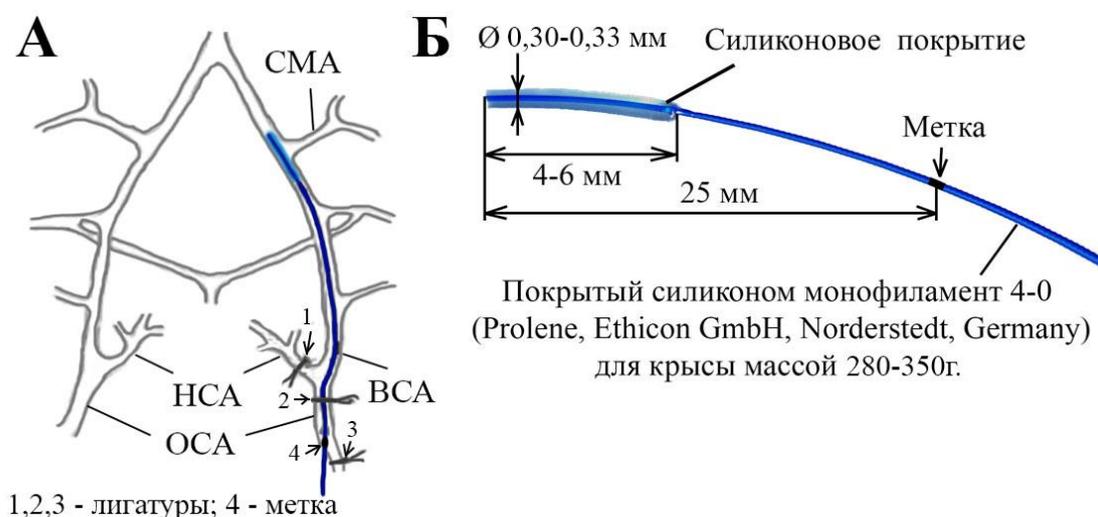
*Примечание: OCA – общая сонная артерия; HCA – наружная сонная артерия; BCA – внутренняя сонная артерия.*

### **2.5.2. Выполнение процедуры временной окклюзии средней мозговой артерии по методу J. Koizumi**

Общий принцип операции по воспроизведению внутрисосудистой обратимой окклюзии средней мозговой артерии представлен на Рис. 9А.

Подготовка операционного поля и оперативный доступ к общей сонной (в нашем случае левой) артерии выполняется также как и при окклюзии общих сонных артерий. Далее выделяется бифуркация левой общей сонной артерии, затем перевязывается общая сонная артерия (ближе к груди) и левая наружная сонная артерия. Отступив 3-4 мм от бифуркации, в общей сонной артерии делается пункционное отверстие в которое вставляют монофиламент 4-

0 (Prolene, Ethicon GmbH, Norderstedt, Germany) [Kuge Y., 1995], концом покрытым силиконом вперед (Рис. 9Б) таким образом, чтобы он пройдя через бифуркацию оказался во внутренней сонной артерии. Затем ориентируясь по метке на окклюдере его вводят далее во внутреннюю сонную на глубину 20-23 мм (но не более), затем общая сонная обратимо затягивается, для избегания кровопотери, операционная рана смачивается физиологическим раствором и накрывается марлевым тампоном, включается таймер на установленное протоколом время. По истечению времени окклюзии, окклюдер извлекается, общая сонная перевязывается, рана промывается раствором хлоргексидина 0,05%, после чего рану ушивают кистетным швом. Кровопотеря во время операции свыше 0,5 мл не допустима, допустимо незначительное капиллярное кровотечение при рассечении кожного покрова. Недопустима остановка дыхания и/или его отчётливое изменение (появление стонов, хрипов, снижение частоты дыхательных актов и т.д.).

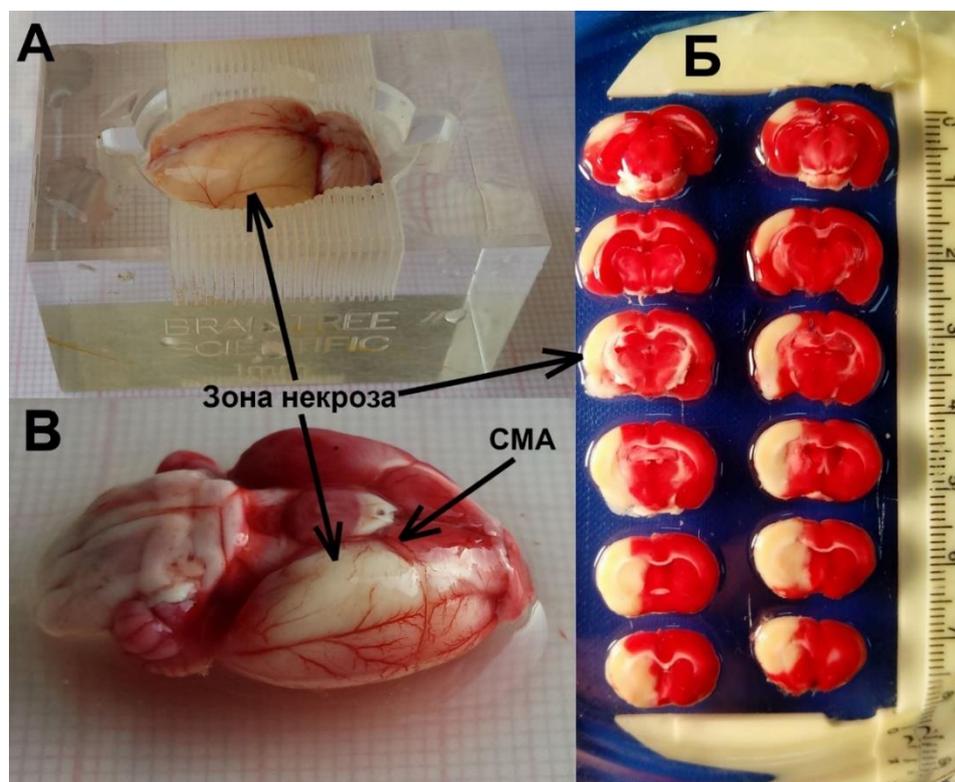


**Рис. 9. Общий принцип операции по воспроизведению обратимой окклюзии средней мозговой артерии (А). Окклюдер для интравазальной окклюзии средней мозговой артерии (Б) [Мирзоян Р.С., 2012; Спасов А.А., 2014; Тюренков И.Н., 2012а,2014; Koizumi J., 1986].**

*Примечание: ОСА – общая сонная артерия; НСА – наружная сонная артерия; ВСА – внутренняя сонная артерия; СМА – средняя мозговая артерия.*

## Оценка скорректированного размера инфаркта и степени отёка

На завершающем этапе исследования для сопоставления выраженности моторных нарушений и размера зоны некроза мозговой ткани выполняли количественную оценку размера некроза по анализу цифровых фотографий окрашенных срезов мозга [Brait V.H., 2010]. Для этого с использованием матрицы BS-A-6000C (Braintree, США) (Рис. 10.А) изготавливались срезы больших полушарий толщиной 2 мм (6 срезов), которые инкубировались в 1% растворе 2,3,5,-трифенилтетразолия хлорида при 37°C в течение 15 минут, через 7-10 минут раствор со срезами осторожно встряхивается. После окрашивания срезы фотографировались на цифровую камеру в одной плоскости с миллиметровой линейкой (Рис. 10.В).

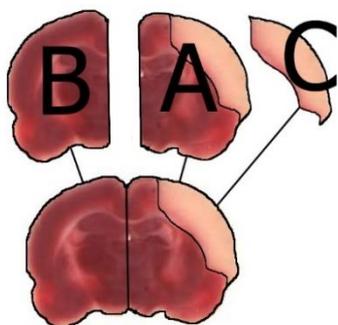


**Рис. 10.** Принцип изготовления срезов ГМ (А), локализация некроза при ОСМА (Б) и фотография срезов ГМ в одной плоскости с миллиметровой линейкой (В).

*Примечание: СМА – средняя мозговая артерия; CIV – скорректированный объем зоны инфаркта.*

Измерение площади окрашенной и неокрашенной ткани осуществлялось при помощи программного обеспечения ImageJ 1.37 (Rasband W.S., США). Для

избегания возможного завышения площади некротической ткани вследствие отека, рассчитывался скорректированный объем зоны инфаркта (ЗИ), который рассчитывался в процентах относительно объема интактной гемисферы по упрощенной формуле [Brait V.H., 2010]:  $ЗИ = \frac{B-(A-C)}{B} \times 100\%$ , а степень отека (СО) мозга рассчитывали по формуле:  $СО = \frac{A-B}{B} \times 100\%$ , где А – суммарная площадь пораженных гемисфер на срезах (мм<sup>2</sup>) (А1+А2...+А6), В – суммарная площадь интактных гемисфер на срезах (мм<sup>2</sup>) (В1+В2...+В6), С – суммарная площадь зон инфаркта на срезах (мм<sup>2</sup>) (С1+С2...+С6) (Рис. 11.).



**Рис. 11. Выделение площади пораженной (А), интактной (В) гемисферы и зоны инфаркта (С) на срезе ГМ в программе ImageJ.**

## **2.6. Оценка степени психоневрологического дефицита**

### ***2.6.1. Оценка неврологического дефицита по шкале McGraw***

После перевязки общих сонных артерий неврологический дефицит оценивали с использованием шкалы stroke-index McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной (Таблица 2) [Ганнушкина И.В., 1996]. После моделирования фокальной ишемии – использовали шкалу Garcia (Таблица 3) и шкалу Combs и D'Alesy (Таблица 4) [Combs D.J., 1987] [Дайнеко А.С., 2014; Garcia J.H., 1995].

Оценка выраженности неврологического дефицита по шкале McGraw проводилась через 12, 24, 48 и 72 часа после необратимой окклюзии общих сонных артерий. При наличии у животного нескольких признаков неврологического дефицита баллы суммировались.

**Таблица 2. Шкала оценки неврологического дефицита по McGraw в модификации И.В. Ганнушкиной [Ганнушкина И.В., 1996]**

Симптомы	Соответствующие баллы
вялость	0,5
тремор	1
односторонний полуптоз	1
двухсторонний полуптоз	1,5
односторонний птоз	1,5
двухсторонний птоз	1,5
слабость конечностей	1,5
манежность движений	2
парез 1,2,3,4 конечностей	2,3,4,5
паралич 1,2,3,4 конечностей	3,4,5,6
состояние комы	7
летальный исход	10

### **2.6.2. Оценка неврологического дефицита по шкале Garcia**

Шкала Garcia [Дайнеко А.С., 2014; Garcia J.H., 1995] используется для оценки асимметрии движений и реакций животного.

**Таблица 3. Оценка неврологического дефицита по шкале Garcia**

Показатель	Начисляемые баллы			
	0	1	2	3
Спонтанная активность (в пустой клетке, в течение 5 мин)	Движения отсутствуют	Едва двигается	Двигается, но не приближается к трем сторонам клетки	Двигается и приближается к трем сторонам клетки
Симметричность движений (4 конечности)	Одна сторона: отсутствует движение	Одна сторона: небольшое движение	Одна сторона: двигается медленно	Обе стороны: двигаются симметрично
Симметричность вытягивания предплечий (крысу держат за хвост)	Одна сторона: отсутствует вытягивание конечности	Одна сторона: слабая попытка вытянуть конечность	С одной стороны пытается вытянуть конечность меньше, чем с другой стороны	Симметричные вытягивания
Забирается по сетке	—	Не удается забраться	Одна сторона слабая	Забирается нормально
Реакция на прикосновение к стороне тела	—	Отсутствует ответ с одной стороны	Слабый ответ с одной стороны	Симметричный ответ
Ответ на прикосновение к вибриссам	—	Отсутствует ответ с одной стороны	Слабый ответ с одной стороны	Симметричный ответ

Итоговый балл является суммой баллов в 6-и тестах. 18 баллов соответствует животному без нарушений.

### **2.6.3. Оценка неврологического дефицита по шкале Combs и D'Alecy**

Шкала оценки неврологического дефицита Combs и D'Alecy [Combs D. J., 1987] представлена в таблице (табл.6). 9 баллов соответствует животному без нарушений. Для исключения погрешностей каждое животное имело 2 попытки.

**Таблица 4. Шкала оценки неврологического дефицита Combs and D'Alecy**

Балл	Удержание себя на экране-сетке	Тест на равновесие на стержне	Удержание себя передними лапами на натянутой веревке
0	Падение 0-5 секунд	Отсутствие хвата, падение со стержня	Вис 0-2 секунды
1	Падение 6-10 секунд	Нахождение на стержне менее 10 секунд	Вис 3-4 секунды
2	Падение 11-14 секунд	Нахождение на стержне 11-20 секунд	Вис более 5 секунд, третья конечность не находится на веревке
3	Вис на сетке больше 15 секунд	Нахождение на стержне 21-30 секунд	Вис более 5 секунд, третья конечность находится на веревке

### **2.6.4. Оценка нарушений координации движений в тесте «Ротарод»**

Для оценки нарушений координации животных использовали аппаратно-программный комплекс «Ротарод» (ООО «Нейроботикс», Россия), который представляет собой горизонтальный стержень (диаметр – 70 мм), разделенный на отсеки (ширина – 70 мм) вертикальными дисками (диаметр – 370 мм) в комплексе с датчиками и программным обеспечением для автоматической регистрации времени падения животных. В нашем исследовании использовалась постоянная скорость вращения стержня – 20 об/мин. Регистрировали латентный период (ЛП) первого падения (время первого падения животного с вращающегося стержня) и суммарное время удержания на вращающемся стержне за 3 попытки [Bohlen M., 2009].

### **2.6.5. Оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в тесте «Открытое поле»**

**Тест «Открытое поле».** «Открытое поле» позволяет оценить выраженность отдельных поведенческих элементов, двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность [Воронина Т.А., 2000,2012; Островская, Р.У., 2012]. Установка ОП (Open Science, Россия) для крыс представляет собой круглую площадку диаметром 97 см ограниченную бортами высотой 40 см, разделенную разметкой на 25 равных секторов, на пересечении которых находятся 16 отверстий (диаметром 2 см). После помещения тестируемого животного в центр установки в течение 3-х минут регистрировали следующие параметры:

- количество пересеченных квадратов, что трактуется как спонтанная двигательная активность;
- суммарное количество стоек и количество обследованных отверстий-норок – как ориентировочно-исследовательская активность [Воронина Т.А., 2012].

С использованием аппаратно-программного комплекса, разработанного для теста «Открытое поле» на кафедре фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ, автоматически регистрировалось трекинг и расстояние, пройденное животным в установке за 3 минуты наблюдения<sup>6</sup>.

### **2.6.6. Оценка когнитивного дефицита в тестах ТЭИ и УРПИ**

Тесты «Условная реакция пассивного избегания» (УРПИ) и тест «экстраполяционного избавления» (ТЭИ) [Воронина Т.А., 2012; Островская, Р.У., 2012] используются для исследования влияния фармакологических средств на формирование, сохранение и воспроизведение памятного следа в условиях патологий.

---

<sup>6</sup> Выражаем глубокую благодарность разработчику аппаратно-программного комплекса, технику-лаборанту кафедры фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ Овчинникову Александру Сергеевичу.

Установка для теста УРПИ представляет собой камеру с освещением, соединенную проходом с темной камерой с электрическим полом (ООО «Нейроботикс», Россия). Тест УРПИ проводили в 3 этапа: «обучение», «воспроизведение №1» (для проверки запоминания) и «воспроизведение №2» после моделирования ишемии ГМ. На этапе «обучения» животное помещали в светлый отсек установки, из которого оно самостоятельно переходило в темный отсек с электродным полом, где получало болевое раздражение ( $U=40В$ , 3 импульса по 0,5 сек). При повторном заходе в темный отсек животное также получало болевое раздражение. Длительность наблюдения – 3 минуты. Спустя 24 часа на этапе «воспроизведения №1» животное опять помещали в светлый отсек установки, и наблюдали за ним в течение 3-х минут. Крысы, зашедшие в темный отсек на этапе «воспроизведения №1» исключались из эксперимента. Через 72 (после ООСА) или 48 (после ОСМА) часов после моделирования ишемического поражения ГМ проводили «воспроизведение №2». Фиксировался латентный период первого захода в темный отсек, при этом болевое раздражение не наносилось.

Установка для ТЭИ (Open Science, Россия) представляет собой цилиндрическую емкость (высота 40 см, диаметр 35 см), в которую до определенного уровня наливается вода ( $t=22^{\circ}C$ ). В центре емкости вертикально закреплен цилиндр, нижняя часть которого опущена в воду на 2,5 см. На этапе «обучения» животное помещается хвостом вниз во внутренний цилиндр и в течение 3-х минут оно должно решить задачу: поднырнуть под край цилиндра, после чего животное извлекается. Спустя 24 часа, при первом воспроизведении исключаются животные, которые не смогли в течение 3-х минут решить «экстраполяционную задачу». «Воспроизведение №2» выполняется аналогично таковому в тесте УРПИ, через 72 (после ООСА) или 48 (после ОСМА) часов после моделирования ишемического поражения ГМ. В тесте ТЭИ фиксируется время решения задачи: латентный период подныривания.

## **2.7. Изучение параметров тромбоцитарного и коагуляционного компонента гемостаза**

### ***2.7.1. Изучение параметров коагуляционного компонента гемостаза***

Тромбиновое (ТВ), протромбиновое (ПВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и содержание фибриногена были определены хронометрически на анализаторе показателей гемостаза АПГ2-01 “МИНИЛАБ 701” (“Юнимед”, Россия) с использованием наборов реактивов производства НПО «Ренам» (Россия) согласно инструкции изготовителя. Кровь для анализа забирали из брюшной аорты. Все коагуляционные анализы проводились на бедной тромбоцитами плазме, полученной при центрифугировании изучаемых образцов цитратной крови при 3000 об/мин в течении 15 минут [Баркаган З.С., 2001].

### ***2.7.2. Исследование тромбоцитарного компонента гемостаза***

Исследование тромбоцитарного компонента гемостаза производили с использованием двухканального лазерного анализатора агрегации тромбоцитов (Биола 220 LA, Россия) по методу Born G. [Born G.V., 1962] в модификации Габбасова З.А. [Габбасов З.А., 1989]. Метод основан на регистрации степени изменений светопропускания богатой тромбоцитами плазмы при добавлении индукторов агрегации, а также на анализе флюктуаций светопропускания, вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале.

В кювету агрегометра вносили 0,3 мл плазмы, инкубировали при температуре 37° С (2 минуты). Далее добавляли индуктор агрегации динатриевую соль аденозин-5-дифосфорной кислоты («Reanal», Венгрия) в конечной концентрации 5 мкМ. При графической регистрации процесса агрегации кровяных пластинок (в течение 5 минут) получали кривые падения оптической плотности, обогащённой тромбоцитами плазмы. Интенсивность агрегации оценивали по величине максимальной амплитуды агрегатограммы. Скорость агрегации оценивали по наклону агрегатограммы.

## 2.8. Оценка эндотелийзависимой вазодилатации

Вазодилатирующую функцию эндотелия оценивали по изменению скорости мозгового кровотока (МК) при внутривенном введении модификаторов синтеза NO: ацетилхолин (Acros organics, США) в дозе 0,01 мг/кг, нитро-L-аргинин (N-L-arg) (Acros organics, США) в дозе 10 мг/кг и нитроглицерин (МТХ, Москва) в дозе 0,007 мг/кг. Каждое следующее введение модификатора осуществлялось после возвращения мозгового кровотока к исходному уровню (около 10 минут) [Тюренков И.Н., 2008]. Регистрация уровня МК осуществлялась в бассейне среднемозговой артерии с помощью полиграфа MP150 Biopac Systems, США), модуля для лазер-доплеровской флоуметрии LDF100C (Biopac Systems, США) и программного обеспечения AcqKnowledge 4.2 (Biopac Systems, USA). При введении модификатора синтеза NO регистрировали изменение скорости МК и вычисляли его измерение относительно исходного уровня в процентах.

Анализ степени изменения уровня МК при введении ацетилхолина и нитро-L-аргинина давало возможность оценить соответственно стимулированную и базальную продукцию NO, и количественно установить степень нарушения вазодилатирующей функции эндотелия в условиях патологического состояния [Воронков А.В., 2008].

## 2.9 Определение концентрации ТБК-активных продуктов в плазме крови

Концентрацию ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) определяли по образованию окрашенного комплекса при взаимодействии продуктов ПОЛ с тиобарбитуровой кислотой [Mihara M., 1978], с помощью стандартного набора фирмы Агат-Мед (Россия) согласно инструкции изготовителя. К 3 мл 1% ортофосфорной кислоты добавляли 0,25 мл плазмы и 1 мл 0,7 % раствора тиобарбитуровой кислоты (ТБК), далее нагревали на водяной бане (60 минут). После остужения добавляли 4 мл бутанола и встряхивали в течение 1 мин до образования однородной белой суспензии. Далее центрифугировали и супернатант фотометрировали при двух длинах волн  $\lambda=535$  нм и  $\lambda=570$  нм 76

против холостой пробы в кювете с длиной оптического пути 1 см. Расчет содержания ТБК-АП проводили по формуле:  $C = \frac{D_{535} - D_{570}}{0,156} \times 16$ , где  $C$  – концентрация ТБК-активных продуктов в опытной пробе;  $D_{535}$  – оптическая плотность пробы при 535 нм;  $D_{570}$  – оптическая плотность при 570 нм; 0,156 – коэффициент молярной экстинкции комплекса малоновый диальдегид-ТБК в л/мкмоль/см; 16 – коэффициент разведения плазмы.

## **2.10. Оценка кислотной резистентности эритроцитов**

Для изучения кислотной резистентности эритроцитов 20 мкл крови смешивали с 20 мл раствора NaCl (0,9%). Измерения оптической плотности производили на спектрофотометр ПЭ-5400в (ЭКРОС, Россия) при длине волны  $\lambda=600$  нм. В кювету (длина оптического пути 1 см) вливали 2 мл взвеси эритроцитов и добавляли к ней 2 мл 0,004 н HCl. Кювету помещали в спектрофотометр, запускали секундомер и каждые 30 секунд отмечали оптическую плотность. Измерение заканчивали при получении двух одинаковых показателей оптической плотности [Чернецкий Г.А., 2002].

## **2.11. Статистическая обработка результатов исследования**

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакетов следующих программ: Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, США), Statistica 6,0 (StatSoft, Inc., США) Prism 5 (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 Дана). Статистически значимыми расценивались различия при  $p < 0,05$  [Гланц С., 1999; Реброва О.Ю., 2006].

### **ГЛАВА 3. Изучение церебропротекторного потенциала ZB-16 в разных дозах при моделировании окклюзии общих сонных артерий у интактных животных**

В клинических исследованиях было установлено, что при терапии СД 2 типа препаратами с инкретиновой активностью снижается риск и/или тяжесть течения нарушений мозгового кровообращения [Власов Т.Д., 2016]. В экспериментальных исследованиях было обнаружено, что подобная терапия снижает тяжесть течения фокальной ишемии ГМ и у интактных животных [Симаненкова А.В., 2014].

Это обосновывает поиск веществ с церебропротекторной активностью среди соединений, повышающих плазменный уровень эндогенных инкретинов, в том числе и посредством стимуляции их секреции (агонистов GPR119). На данном этапе исследования мы оценили церебропротекторный потенциал агониста рецептора GPR119 в условиях экспериментальной ишемии ГМ у интактных животных при лечебно-профилактическом введении.

#### **3.1. Оценка летальности после ООСА**

Перевязка сонных артерий вызвала гибель большинства животных группы контроль-ишемия (60%), которые получали физиологический раствор в качестве лечения (Таблица 5). Введение соединения ZB-16 в дозе 1 мг/кг не приводило к значительному снижению количества погибших, однако в группах, получавших его в дозах 10 и 25 мг/кг, наблюдалась сходная тенденция к снижению количества умерших животных по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,1$ ) (по 4 погибших животных из 12 (33%)). При этом, основная гибель животных с ишемией в контрольной группе (6 из 9 погибших животных) произошла в первые сутки наблюдения, в отличие от группы, получавшей ZB-16 в дозе 10 мг/кг (2 из 4 погибших животных). Таким образом, наименьшая общая летальность в течение 72 часов после ООСА наблюдалась в группах, получавших агонист GPR119 в дозах 10 и 25 мг/кг, что было сопоставимо с таковой в группе, получавшей цитиколин.

**Таблица 5. Летальность животных после перевязки общих сонных артерий и введения агониста рецептора GPR119.**

Группа	Количество погибших животных после ООСА					n	%
	6 часов	12 часов (сумма)	24 часа (сумма)	48 часа (сумма)	72 часа (сумма)		
ЛО + физ.р-р	-	-	-	-	-	10	0
ООСА + физ.р-р	2	1 (3)	3 (6)	2 (8)	1 (9)	15	60
ООСА + ZB-16 (1 мг/кг)	1	3 (4)	- (4)	1 (5)	1 (6)	12	50
ООСА + ZB-16 (10 мг/кг)	1	- (1)	1 (2#)	2 (4)	- (4#)	12	33
ООСА + ZB-16 (25 мг/кг)	1	1 (2)	1 (3)	- (3#)	1 (4#)	12	33
ООСА + Цитиколин	-	2 (2)	- (2#)	- (2*)	1 (3*)	12	25

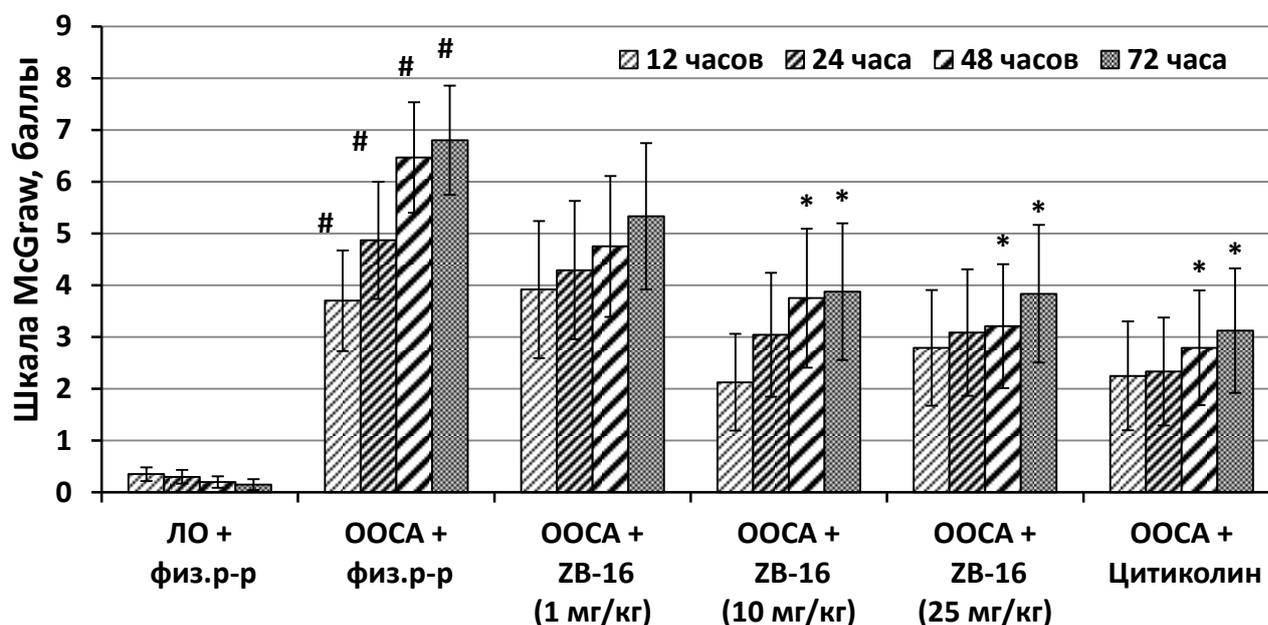
*Примечание: «ЛО+физ.р-р» – ложно-оперированные животные; «ООСА+физ.р-р» – животные с окклюзией общих сонных артерий (ООСА) без лечения; n – количество животных в группе; % – относительное количество погибших животных в группе в процентах; \* – различия достоверны относительно группы «ООСА+физ.р-р» при  $p < 0,05$ , # – тенденция к снижению количества погибших животных по сравнению с группой «ООСА+физ.р-р» ( $p < 0,1$ ) (критерий хи-квадрат).*

### 3.2. Оценка неврологического дефицита по шкале McGraw

При оценке выраженности неврологического дефицита по шкале McGraw в контрольной группе, не получавшей лечение ("ООСА+физ.р-р"), средний балл по шкале McGraw был высоким, что обусловлено большей гибелью животных и наличием у выживших таких симптомов неврологического дефицита, как двухсторонний птоз, слабость конечностей, манежность движений и состояние предкомы и комы. Спустя 24 часа после перевязки ОСА неврологический балл группы «ООСА+физ.р-р» составил  $4,9 \pm 1,1$  балла, а через 48 и 72 часа уже  $6,5 \pm 1,1$  и  $6,8 \pm 1,1$  баллов соответственно (Рис. 12).

Введение исследуемого соединения, как в дозе 10, так и в дозе 25 мг/кг ограничивало развитие неврологического дефицита. Так, в группах животных, которым исследуемое соединение вводили в дозе 10 и 25 мг/кг общий неврологический балл через 24 часа был равен  $3,0 \pm 1,2$  и  $3,1 \pm 1,2$

соответственно, а через 72 часа после моделирования НМК он составил  $3,9 \pm 1,3$  и  $3,8 \pm 1,3$  соответственно, что было статистически значимо ниже, чем в контрольной группе. У животных, получавших препарат сравнения цитиколин, через 3-е суток после перевязки ОСА средний балл неврологического дефицита в группе был равен  $3,1 \pm 1,2$  (Рис. 12). Таким образом, введение исследуемого агониста GPR119 в дозе 10 и 25 мг/кг достоверно снижало количество и/или тяжесть неврологических симптомов у животных после перевязки сонных артерий, незначительно уступая по эффективности цитиколину.



**Рис. 12. Неврологический дефицит животных в баллах (McGraw).**

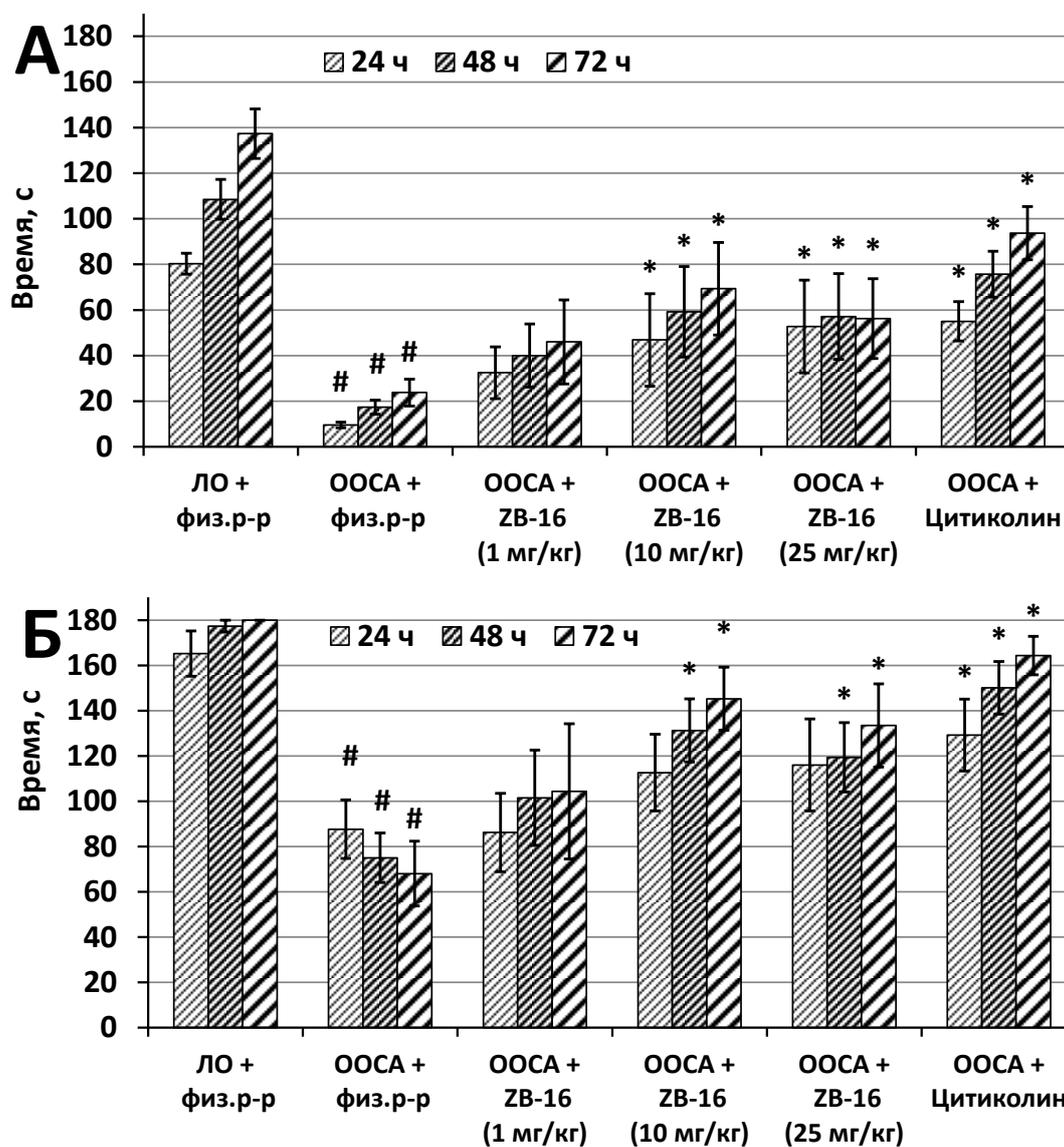
*Примечание: «ЛО+физ.р-р» – ложно-оперированные животные; «OOSA+физ.р-р» – животные с окклюзией общих сонных артерий (OOSA) без лечения; # – различия достоверны относительно группы «ЛО+физ.р-р» при  $p < 0,05$ ; \* – различия достоверны относительно группы «OOSA+физ.р-р» при  $p < 0,05$  (критерий Дана).*

### 3.3. Оценка нарушений координации движений в тесте «Ротарод»

Для оценки нарушений координации движений после моделирования различных патологий мозгового кровообращения в экспериментальной практике широко используется тест «Ротарод».

Тест «Ротарод» проводили через 24, 48 и 72 часа после перевязки общих сонных артерий, в нем фиксировались 2 показателя: латентный период первого

падения и суммарное время удержания за 3 попытки в течение 3-х минут [Bohlen M., 2009]. В контрольной группе наблюдалось значительное снижение обоих показателей (в 2-6 раз по сравнению с интактной), при этом наблюдалась регрессия суммарного времени удержания с первых к третьим суткам тестирования (Рис. 13).



**Рис. 13.** Время удержания на вращающемся стержне в тесте «Ротарод» за 1 попытку (А) и за 3 попытки (Б) у животных после окклюзии ОСА.

*Примечание:* «ЛО+физ.р-р» – ложно-оперированные животные; «OOSA+физ.р-р» – животные с окклюзией общих сонных артерий (OOSA) без лечения; # – различия достоверны относительно группы «ЛО+физ.р-р» при  $p < 0,05$ ; \* – различия достоверны относительно группы «OOSA+физ.р-р» при  $p < 0,05$  (критерий Дана).

У животных, получавших соединение ZB-16 в разных дозах наблюдалось восстановление нарушенной координации. Так по обоим оцениваемым показателям животные, получавшие соединение ZB-16 в дозах 10 и 25 мг/кг достоверно превосходили показатели группы «ООСА+физ.р-р» и не уступали тем, которые получали цитиколин (Рис. 13А и Б).

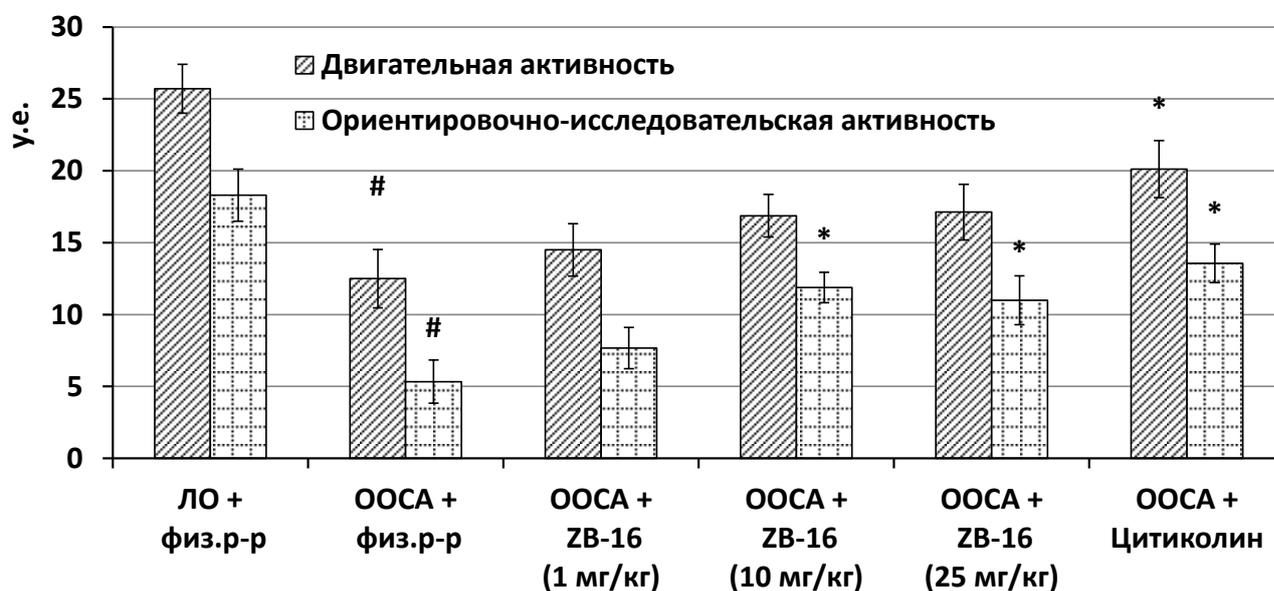
### **3.4. Оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в тесте «Открытое поле»**

В тесте «Открытое поле» при наблюдении за животным в течение 3-х минут учитывались 2 показателя: количество пересеченных квадратов (показатель двигательной активности), а также сумма выполненных стоек и обследованных отверстий-норок (показатель ориентировочно-исследовательской активности) [Воронина Т.А., 2012].

Тестирование животных с ишемией в тесте «Открытое поле» через 72 часа после перевязки общих сонных артерий показало, что у животных, не получавших лечения двигательная и ориентировочно-исследовательская активность по сравнению с интактной группой была ниже на 51% и 71% соответственно; движение в тестовой установке носило хаотичный характер с редкими заглядываниями в норки и стойками, при этом животные не обследовали все пространство тестовой установки, предпочитая определенную, выбранную ими зону.

В группе, получавшей соединение ZB-16 в дозе 1 мг/кг, по сравнению с контрольной, наблюдалось умеренное (на 16%) повышение двигательной активности и значимый рост показателей ориентировочно-исследовательской (на 44%) (Рис. 14). При этом, на фоне введения исследуемого соединения в дозах 10 и 25 мг/кг через 72 часа после моделирования НМК показатель ориентировочно-исследовательской активности в данных группах превышал более, чем в 2 раза таковой в группе без лечения. Также можно отметить, что по результатам теста «Открытое поле», с повышением дозы от 1 до 10 мг/кг отчётливо просматривается повышение эффекта, а результаты групп,

получавших ZB-16 в дозе 10 и 25 мг/кг, практически не отличаются. При этом препарат сравнения цитиколин значительно увеличивал оба показателя в тесте «Открытое поле» превышая по эффективности соединения ZB-16 во всех дозах.



**Рис. 14.** Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных, получавших до и после перевязки общих сонных артерий агонист рецептора GPR119.

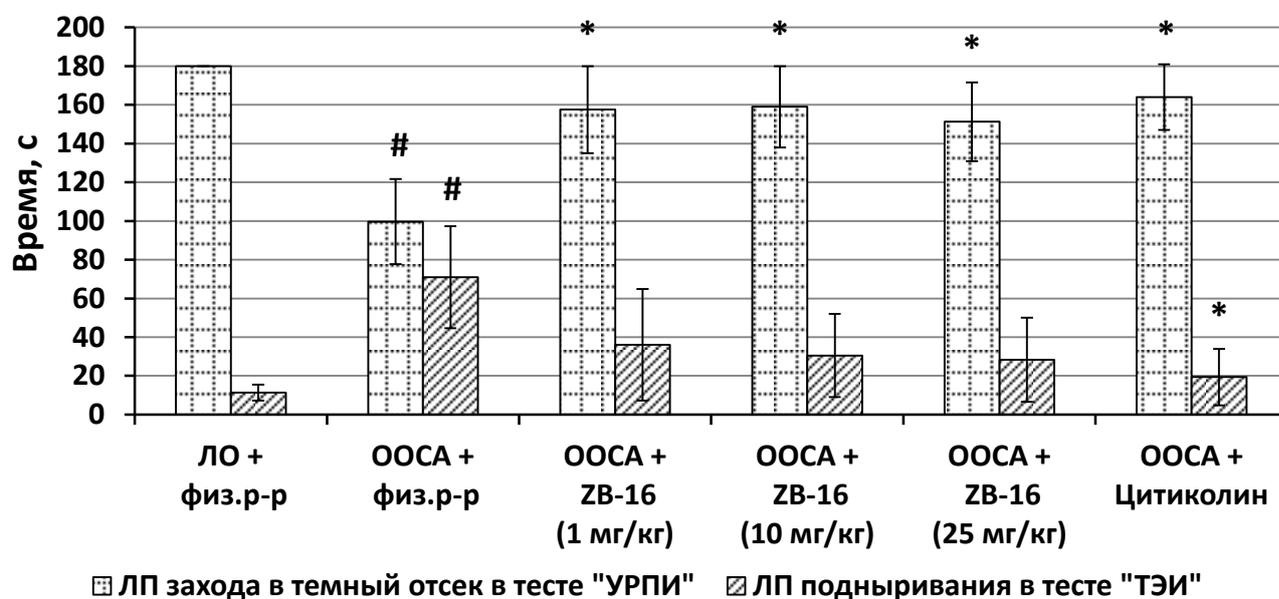
*Примечание:* «ЛО+физ.р-р» – ложно-оперированные животные; «ОOSA+физ.р-р» – животные с окклюзией общих сонных артерий (ОOSA) без лечения; у.е. – условные единицы (см. в тексте); # – различия достоверны относительно группы «ЛО+физ.р-р» при  $p < 0,05$ ; \* – различия достоверны относительно группы «ОOSA+физ.р-р» при  $p < 0,05$  (критерий Дана).

### 3.5. Оценка когнитивного дефицита в тестах ТЭИ и УРПИ

За 3 дня до моделирования окклюзии ОСА животные были обучены в тестах ТЭИ и УРПИ. Спустя 72 часа после операции, в них была произведена оценка нарушения памяти у животных всех экспериментальных групп. Было обнаружено, что в контрольной группе животные чаще и быстрее, после помещения в установку заходили в темный отсек (УРПИ), а также значительно дольше по времени решали задачу экстраполяционного избавления (ТЭИ) (Рис. 15).

В группах, получавших соединение ZB-16 в дозах 1, 10 и 25 мг/кг, а также препарат сравнения цитиколин в тесте УРПИ наблюдалось значимое

повышение латентного периода захода в темный отсек. В тесте ТЭИ значимое снижение латентного периода подныривания наблюдалось в группе, получавшей цитиколин, в то время как, группах, получавших соединение ZB-16 во всех дозах наблюдалась сопоставимая тенденция к снижению времени решения экстраполяционной задачи.



**Рис. 15.** Латентный период захода в темный отсек в тесте УРПИ и латентный период подныривания в тесте ТЭИ.

*Примечание:* «ЛО+физ.р-р» – ложно-оперированные животные; «OOSA+физ.р-р» – животные с окклюзией общих сонных артерий (OOSA) без лечения; # – различия достоверны относительно группы «ЛО+физ.р-р» при  $p < 0,05$ ; \* – различия достоверны относительно группы «OOSA+физ.р-р» при  $p < 0,05$  (критерий Дана).

Эти данные свидетельствуют о том, что у животных, получавших агонист рецептора GPR119 до и после моделирования OOSA, лучше сохранялся памятный след и когнитивный потенциал у них не отличался от такового у животных, получавших препарат сравнения цитиколин.

## Заключение

По результатам проведенного исследования было отмечено, что лечебно-профилактическое введение агониста GPR119, соединения ZB-16 снижало смертность и тяжесть течения ишемии ГМ при одномоментной окклюзии общих сонных артерий у интактных животных. При повышении дозы

соединения ZB-16 с 1 до 10 мг/кг наблюдалось значимое повышение церебропротекторного эффекта, а при дальнейшем повышении дозы до 25 мг/кг уже не наблюдалось усиления протекторного эффекта соединения.

Таким образом, в условиях билатеральной одномоментной окклюзии общих сонных артерий у интактных животных, была выявлена эффективная доза соединения ZB-16 соответствующая 10 мг/кг, в которой оно оказывало максимальное церебропротекторное действие, при дальнейшем ее повышении увеличения эффекта не наблюдалось.

Агонисты рецептора GPR119 разрабатываются в качестве пероральных гипогликемических препаратов для длительного применения у пациентов с СД 2 типа. По этой причине целесообразно изучить влияние агонистов GPR119 на течение ишемического инсульта в условиях экспериментального сахарного диабета. И на следующем этапе исследованиями нами была проведена оценка церебропротекторного действия соединения ZB-16 на модели фокальной ишемии головного мозга в условиях стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД.

#### **ГЛАВА 4. Исследование влияния лечебно-профилактического введения агониста рецептора GPR119 и препаратов сравнения на течение ишемического процесса при окклюзии средней мозговой артерии на фоне сахарного диабета**

Сахарный диабет является одной из самых распространенных причин сердечно-сосудистых осложнений, в том числе и инсульта, что является следствием ряда патогенетических процессов: образования атеросклеротических бляшек на стенках магистральных сосудов, снижения синтеза эндотелием вазодилатирующих, антикоагулянтных и противовоспалительных факторов [Касаткина, С.Г., 2011; Оскола, Е.В., 2013]. Спонтанный тромбоз церебрального сосуда у пациента с СД приводит к большему размеру инфаркта, как из-за сниженной способности к вазодилатации коллатеральных сосудов, так и из-за прокоагулянтного состояния системы свертывания крови [Гудкова В.В., 2015; Jia, Q., 2011]. Строгий контроль гликемии значительно снижает риск развития инсульта, его размер и тяжесть последствий, облегчает и сокращает период реабилитации [Kishore P., 2012]. В проведенном клиническом исследовании LEADER (2010-2015, 9340 участников) было показано, что добавление к гипогликемической терапии лираглутида (аналога ГПП-1) привело к значительному снижению вероятности развития сердечно-сосудистых осложнений СД 2 типа и количества умерших от осложнений пациентов [Marso S.P., 2016].

В нашем исследовании, животные со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД в течение 4-х недель в качестве лечения получали агонист GPR119, соединение ZB-16 или гипогликемические препараты: метформин и госоглиптин. Далее животным моделировали фокальную ишемию головного мозга, путем временной окклюзии среднемозговой артерии. Через 24 и 48 часов после операции регистрировали неврологический дефицит, а в конце эксперимента оценивали функциональное состояние эндотелия, объем инфаркта и степень отека мозга, определяли плазменное содержание продуктов перекисного окисления, а также кислотную резистентность эритроцитов.

С учетом результатов предыдущих исследований, после моделирования экспериментального диабета, в течение 28 дней до моделирования ишемии соединение ZB-16 вводили в дозе 1 мг/кг (*per os*), после окклюзии СМА дозу увеличивали до 10 мг/кг.

#### **4.1. Выбор продолжительности окклюзии СМА для использования в качестве модели фокальной ишемии у животных с СД**

Для исследования нейропротекторных свойств соединений *in vivo* во всем мире наиболее широко распространен метод моделирования фокальной ишемии головного мозга посредством временной внутрисосудистой окклюзии средней мозговой артерии. Подробно описаны 2 метода введения окклюдера во внутреннюю сонную артерию: через внешнюю сонную с последующим восстановлением кровотока по общей сонной [Longa E.Z., 1989] и через перфорацию в перманентно перевязанной общей сонной артерии [Koizumi J., 1986]. После сравнения обоих методов в наших исследованиях и по литературным данным, было сделано заключение об отсутствии значимых различий тяжести ишемического повреждения ГМ (размер инфаркта и возникающие неврологические нарушения) при воспроизведении этих 2-х методов [Morris G.P., 2016]. При этом выполнение ОСМА по методу Longa занимает по времени 30-40 минут, а по методу Koizumi – 15-20 минут. Исходя из чего, для нашего исследования мы выбрали методику Koizumi.

Определяющим параметром, от которого зависит тяжесть ишемического повреждения ГМ является продолжительность окклюзии СМА. В разных исследованиях она составляет 1-2 часа для интактных животных [Спасов А.А., 2014; Тюренков И.Н., 2014]. По результатам наших исследований, проведенных на здоровых взрослых крысах самцах линии Wistar, окклюзия СМА на 2 часа вызывает поражение значительной части гемисферы (до 30%), а на 1 час только до 20% [Тюренков И.Н., 2012а,2014]. Однако поскольку наличие сахарного диабета значительно утяжеляет течение НМК, мы провели отдельный

эксперимент, целью которого стал выбор оптимальной продолжительности окклюзии СМА на фоне экспериментального СД.

Было создано 6 экспериментальных групп, 3 из которых составляли здоровые крысы-самцы линии Wistar (7-8 мес, 330-360г) и 3 группы, состоящих из животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД продолжительностью 4 недели (Таблица 6). Каждая группа разделялась на 2 части, одной моделировали окклюзию СМА в течение 30 минут, другой в течение 60 минут. На протяжении 48 часов в каждой группе фиксировалась гибель животных.

По результатам эксперимента выяснилось, что окклюзия СМА на 60 минут у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД протекает гораздо тяжелее, чем у здоровых. В группе здоровых крыс с ОСМА наблюдалась единичная гибель, при этом в группах животных с диабетом и ОСМА наблюдалась большая гибель: 80% у не получавших лечение и 50% в группе, получавшей цитиколин. При снижении продолжительности ОСМА до 30 минут в группе здоровых крыс с ОСМА отсутствовали видимые признаки неврологического дефицита. При этом в группе животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД без лечения количество погибших снизилось до 30%, а в группе, получавшей цитиколин до 10%.

Такой результат свидетельствует о значительном снижении устойчивости животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД к ишемическому повреждению ГМ, что может быть следствием эндотелиальной дисфункции, прокоагулянтного состояния системы гемостаза и метаболических нарушений в организме животных.

Таким образом, для исследования церебропротекторных свойств соединения ZB-16 на фоне сахарного диабета была выбрана модель 30 минутной окклюзии ОСМА.

**Таблица 6. Смертность после окклюзии СМА продолжительностью 30 и 60 минут у здоровых животных и крыс со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД (n=10).**

Группа	время ОСМА, мин	Количество погибших животных после ОСМА				сумма	%
		6 часов	12 часов	24 часа	48 часов		
Интактные крысы-самцы							
ЛО+физ.р-р	30	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-
ОСМА+физ.р-р	30	-	-	-	-	-	-
	60	-	1	-	-	1	10%
ОСМА+Цитиколин <sup>7</sup>	30	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-
Крысы со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД продолжительностью 4 недели							
СД+ЛО +физ.р-р	30	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-
СД+ОСМА+физ.р-р	30	-	1	1	1	3	30%
	60	3	3	2	-	8	80%
СД+ОСМА +Цитиколин	30	-	-	1	-	1	10%
	60	1	2	1	1	4	50%

*Примечание: «ЛО+физ.р-р» – ложно-оперированные интактные животные; «ОСМА+физ.р-р» – группа с окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА) без лечения; «СД+ЛО+физ.р-р» – ложно-оперированные животные со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД; «СД+ОСМА+физ.р-р» – группа с ОСМА на фоне стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД без лечения; n – количество животных в группе; % – относительное количество погибших животных в группе в процентах.*

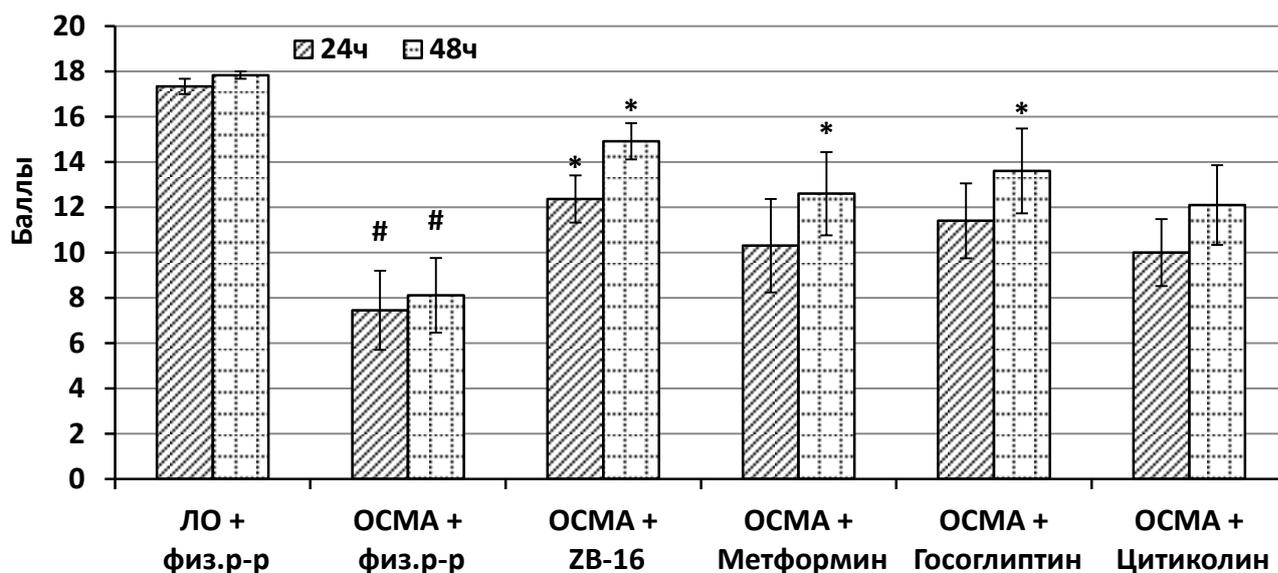
#### **4.2. Оценка неврологического дефицита по шкале Garcia**

Шкала Garcia предназначена для оценки выраженности одностороннего повреждения ГМ. Она учитывает одностороннюю слабость конечностей и нарушение чувствительности частей тела, а также нарушение спонтанной двигательной активности. При оценке уровня неврологического дефицита по шкале Garcia животному по нескольким критериям присваивались баллы

<sup>7</sup> Цитиколин вводили через 1 час после моделирования НМК и далее 1 раз в сутки

(Таблица 3) с последующим их суммированием (максимальный балл, соответствующий здоровому животному равен 18).

Моделирование 30-ти минутной окклюзии СМА вызывало значительный неврологический дефицит у животных с 4-х недельным стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД ("ОСМА+физ.р-р"), который выражался в виде таких симптомов, как снижение спонтанной двигательной активности и ответа на прикосновение к вибриссам, появление манежности и асимметрии движений конечностей. Итоговый балл в данной группе через 24 и 48 часов после операции был равен  $7,7 \pm 1,8$  и  $8,8 \pm 1,8$  соответственно (Рис. 16). В группах, получавших лечение наблюдалась в разной степени выраженная позитивная тенденция, заключающаяся в повышении спонтанной активности и мышечного тонуса.



**Рис. 16. Неврологический дефицит животных в баллах по шкале Garcia у животных с фокальной ишемией ГМ на фоне сахарного диабета.**

*Примечание:* «ЛО+физ.р-р» – ложно-оперированные интактные животные; «ОСМА+физ.р-р» – группа с окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА) без лечения; # – различия достоверны относительно группы «ЛО+физ.р-р» при  $p < 0,05$ ; \* – различия достоверны относительно группы «ОСМА+физ.р-р» при  $p < 0,05$  (критерий Дана).

У животных, которым вводили соединение ZB-16 в течение всего эксперимента, уровень неврологического дефицита по шкале Garcia был значимо ниже ( $13,2 \pm 0,9$  и  $15,0 \pm 0,8$  баллов через 24 и 48 часов соответственно

( $p < 0.05$ ). В группах, получавших в течение 4-х недель перед ОСМА гипогликемические препараты метформин и глосглиптин наблюдалось значимое снижение неврологического дефицита по шкале Garcia спустя 48 часов после операции по сравнению с контрольной группой ("ОСМА + физ.р-р"), но баллы были ниже, чем у животных, которым вводили соединение ZB-16.

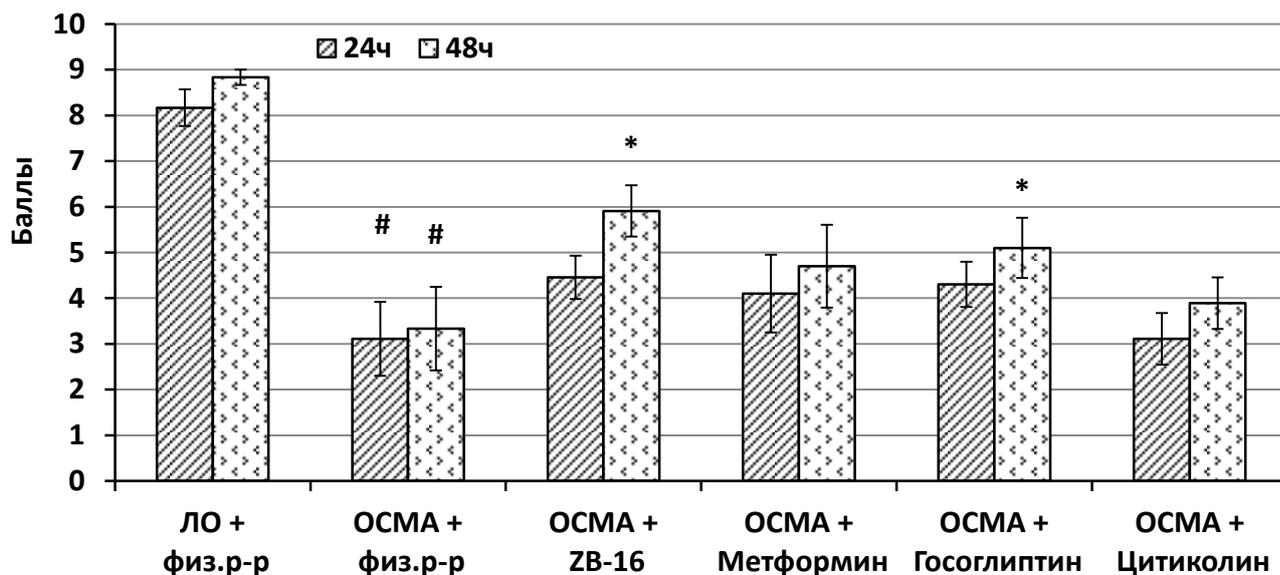
Стоит отметить, что лечебное введение средства с церебропротекторной активностью – цитиколина, животным со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, не получавшим гипогликемическую терапию, приводило к менее значимому снижению уровня неврологического дефицита после ОСМА. С другой стороны, введение животным со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД в течение 4-х недель до ОСМА метформина, способствовало снижению неврологического дефицита через 48 часов после операции по сравнению с контрольной группой. Подобное наблюдение подтверждает важность поддержания нормогликемии не только для снижения риска развития сердечно-сосудистых осложнений СД, но и для снижения тяжести течения спонтанно возникшего ишемического инсульта. При этом нейропротекторная терапия может оказаться неэффективной при лечении острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) у пациента с гипергликемией.

#### **4.3. Оценка неврологического дефицита по шкале Combs и D'Alecy**

Шкала Combs и D'Alecy предназначена для оценки мышечной силы, цепкости и способности сохранять равновесие. При оценке неврологического дефицита по шкале Combs и D'Alecy также присваивались баллы по нескольким критериям (Таблица 4) с последующим их суммированием (максимальный балл, соответствующий здоровому животному равен 9).

У животных контрольной группы "ОСМА+физ.р-р" отмечались следующие симптомы: неспособность сохранить равновесие на неподвижном стержне более 10 секунд, а также неспособность удержать свой вес передними лапами на натянутой веревке (более 5 секунд) и вертикальной металлической

сетке (более 5 секунд). Уровень неврологического дефицита по шкале Combs и D'Alecy через 24 и 48 часов после операции равнялся  $3,1 \pm 0,8$  и  $3,3 \pm 0,9$  баллам соответственно (Рис. 17). В группах, получавших лечение гипогликемические препараты, уровень неврологического дефицита был менее выражен, а ко вторым суткам наблюдалась позитивная динамика, выражавшаяся в повышении мышечного тонуса.



**Рис. 17. Неврологический дефицит животных в баллах по шкале Combs и D'Alecy у животных с фокальной ишемией ГМ на фоне сахарного диабета.**

*Примечание:* «ЛО+физ.р-р» – ложно-оперированные интактные животные; «ОСМА+физ.р-р» – группа с окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА) без лечения; # – различия достоверны относительно группы «ЛО+физ.р-р» при  $p < 0,05$ ; \* – различия достоверны относительно группы «ОСМА+физ.р-р» при  $p < 0,05$  (критерий Дана).

У животных, получавших соединение ZB-16 в течение всего эксперимента, уровень неврологического дефицита по шкале Combs и D'Alecy был значимо меньше, чем в контрольной, через 48 часов после моделирования ОСМА ( $5,9 \pm 0,6$ ;  $p < 0,05$ ). Введение метформина и госоглиптина в течение 4-х недель перед ОСМА менее значимо снизило выраженность неврологического дефицита у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД по сравнению с контрольной группой. Неврологический дефицит в данных группах, через 24 и 48 часов соответственно был равен  $4,1 \pm 0,8$  и  $4,7 \pm 0,9$  ("ОСМА+Метформин"), а также  $4,3 \pm 0,5$  и  $5,1 \pm 0,7$  ("ОСМА+Госоглиптин")

баллам. Введение цитиколина животным с сахарным диабетом, не получавшим гипогликемические препараты до ОСМА, практически не уменьшало выраженность неврологического дефицита.

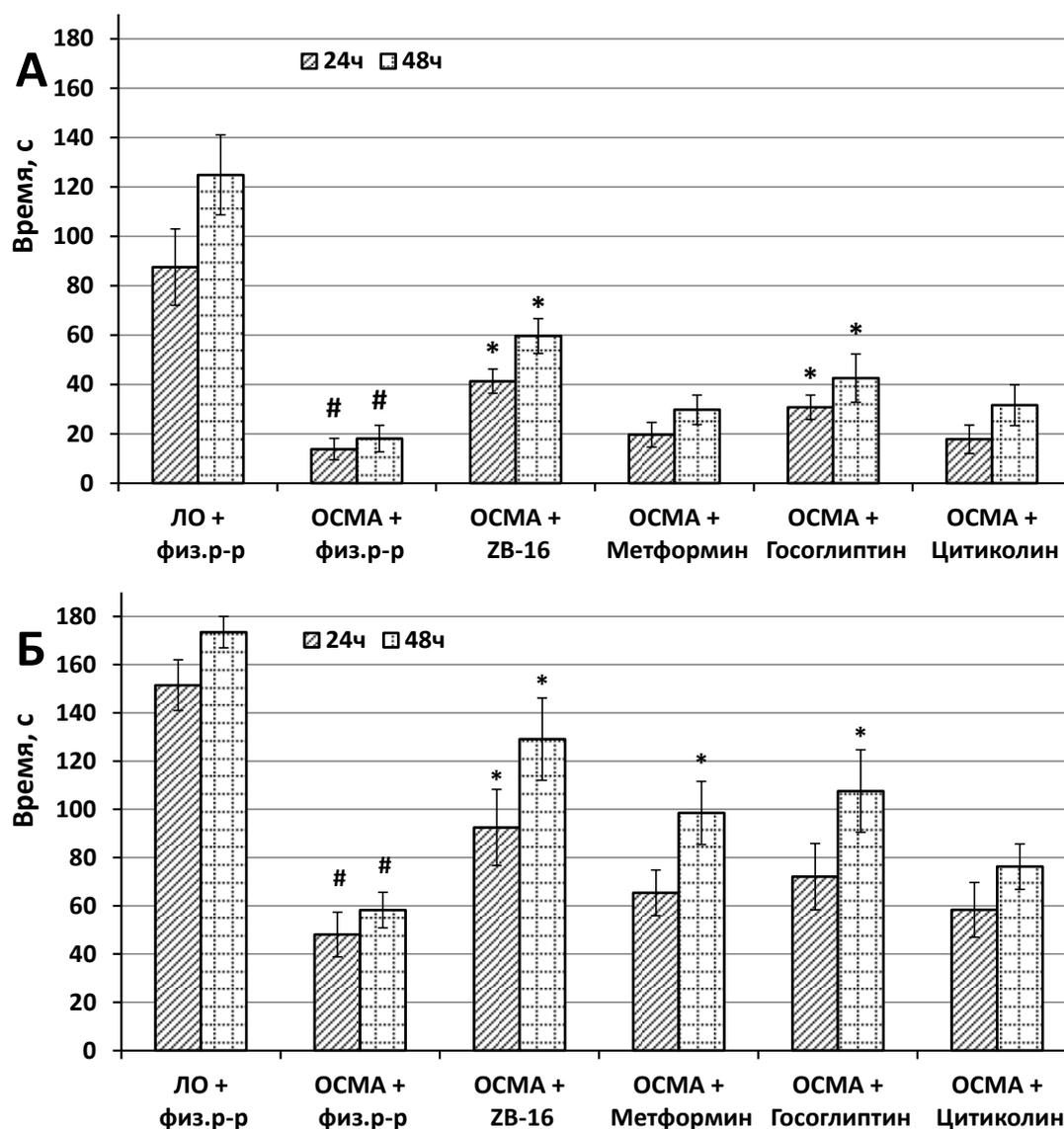
Таким образом, курсовое введение агониста GPR119, соединения ZB-16 животным со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД способствует меньшему росту неврологического дефицита (по шкале «García» и «Combs и D'Alencu») после моделирования фокальной ишемии головного мозга по сравнению с группой животных без лечения и животными, получавшими метформин, госоглиптин и препарат сравнения цитиколин.

#### **4.4. Оценка нарушений координации движений в тесте «Ротарод»**

Через 24 и 48 часов после моделирования ОСМА у животных оценивалась выраженность нарушений координации в тесте «Ротарод». Регистрировались латентный период (ЛП) первого падения животного с вращающегося стержня и суммарное время его удержания на нем за 3 попытки [Bohlen M., 2009].

Моделирование 30 минутной окклюзии СМА у крыс вызвало возникновение значительных нарушений силы и координации в контрольной группе, которая не получала гипогликемическую терапию. В данной группе был особенно снижен ЛП первого падения ( $13,8 \pm 4,4$  и  $18,0 \pm 5,4$  секунд через 24 и 48 ч после ОСМА соответственно), в отличие от такового в группе ложно-оперированных животных ( $87,5 \pm 15,5$  и  $124,8 \pm 16,2$  соответственно) (Рис. 18).

У животных, получавших лечение, наблюдались менее выраженные нарушения силы и координации с позитивной динамикой на 2-е сутки наблюдения, которая выражалась в увеличении ЛП первого падения и особенно суммарного времени удержания за 3 попытки. В группе, получавшей агонист рецептора GPR119 в тесте «Ротарод» регистрировались более высокие показатели, чем в контрольной группе и у животных, которым вводились препараты сравнения (Рис. 18А и Б).



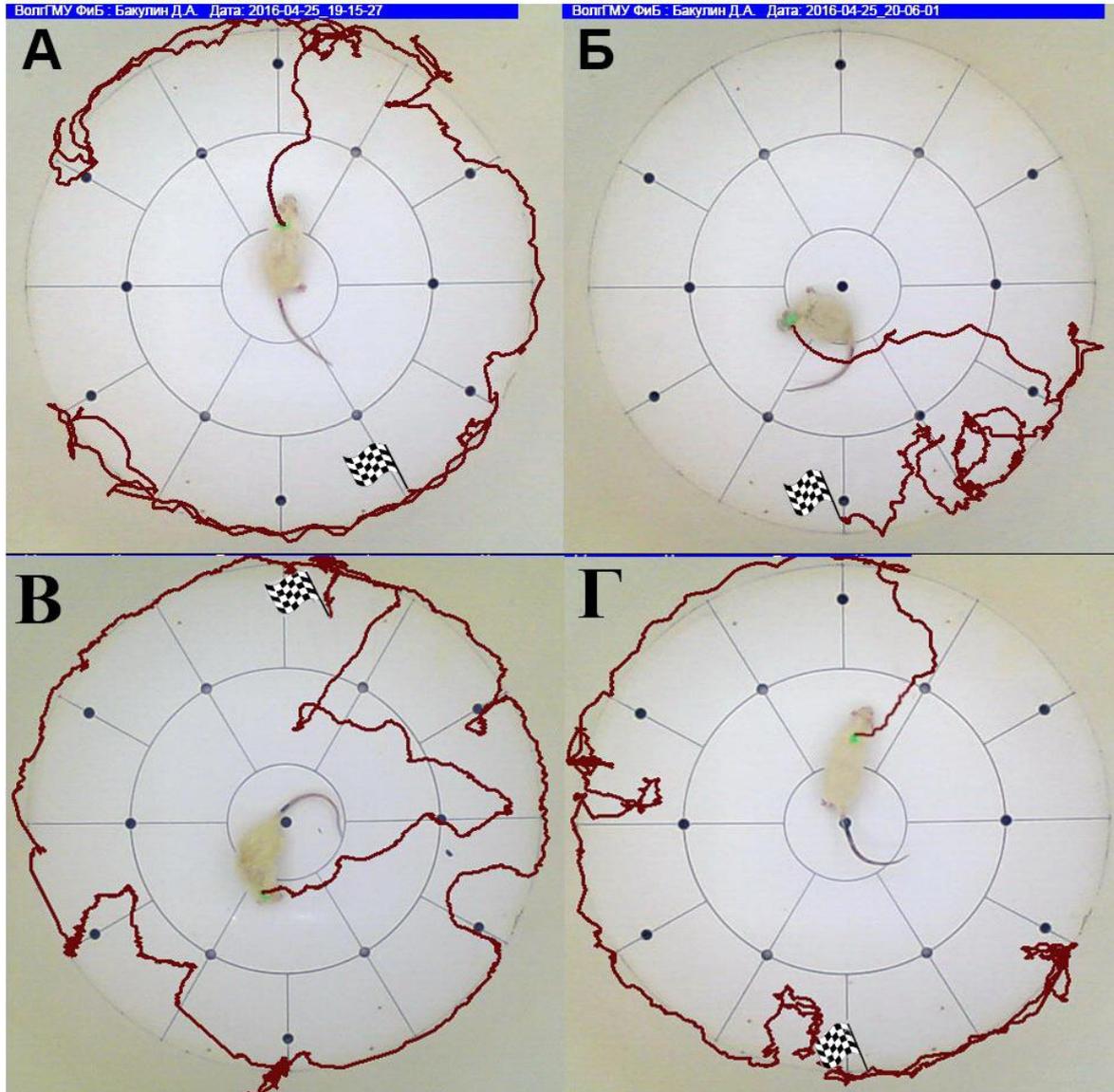
**Рис. 18.** Время удержания на вращающемся стержне в тесте «Ротарод» за 1 попытку (А) и за 3 попытки (Б) у животных после окклюзии СМА на фоне сахарного диабета.

*Примечание:* «ЛО+физ.р-р» – ложно-оперированные интактные животные; «ОСМА+физ.р-р» – группа с окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА) без лечения; # – различия достоверны относительно группы «ЛО+физ.р-р» при  $p < 0,05$ ; \* – различия достоверны относительно группы «ОСМА+физ.р-р» при  $p < 0,05$  (критерий Дана).

#### **4.5. Оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в тесте «Открытое поле»**

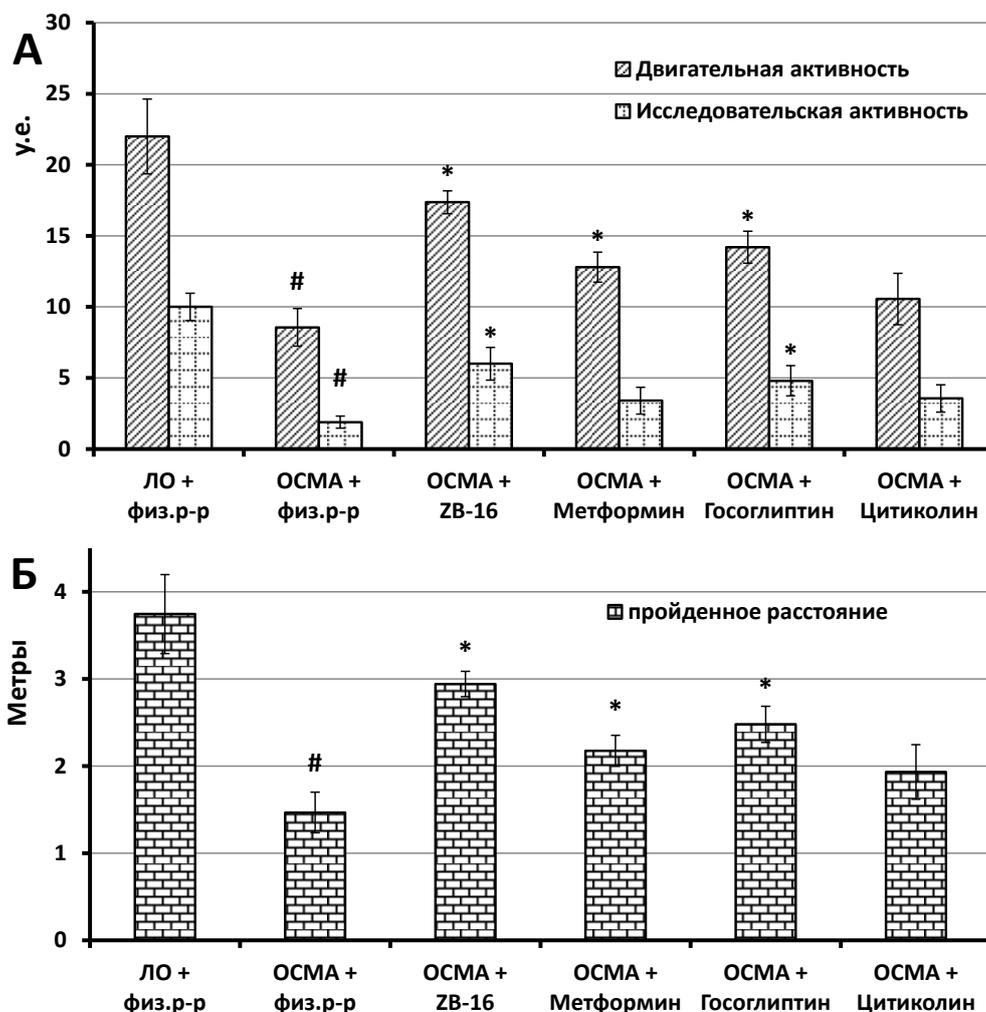
Через 48 часов после ОСМА в тесте «Открытое поле» в течение 3-х минут учитывались количество пересеченных квадратов (показатель двигательной активности), а также сумма выполненных стоек и обследованных отверстий-

норок (показатель ориентировочно-исследовательской активности) [Воронина Т.А., 2012], оценивался трекинг их передвижений.



**Рис. 19.** Характерная траектория движения в тесте Открытое поле для групп «ЛО+физ.р-р» (А), «ОСМА+физ.р-р» (Б), «ОСМА+ZB-16» (В) и «ОСМА+Госоглиптин» (Г).

В тесте «Открытое поле» животные контрольной группы спустя 48 часов после моделирования ОСМА показывали значимое снижение количества пересеченных квадратов (пройденного расстояния) и ориентировочно-исследовательской активности по сравнению с группой ложнооперированных животных ("ЛО+физ.р-р") – ниже на 61% и 81% соответственно. Животные данной группы в основном двигались на небольшом участке с редкими заглядываниями в норки и редкими стойками (Рис. 19).



**Рис. 20.** Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных через 48 часов после моделирования с фокальной ишемии ГМ на фоне сахарного диабета.

*Примечание:* «ЛО+физ.р-р» – ложно-оперированные интактные животные; «ОСМА+физ.р-р» – группа с окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА) без лечения; # – различия достоверны относительно группы «ЛО+физ.р-р» при  $p < 0,05$ ; \* – различия достоверны относительно группы «ОСМА+физ.р-р» при  $p < 0,05$  (критерий Дана).

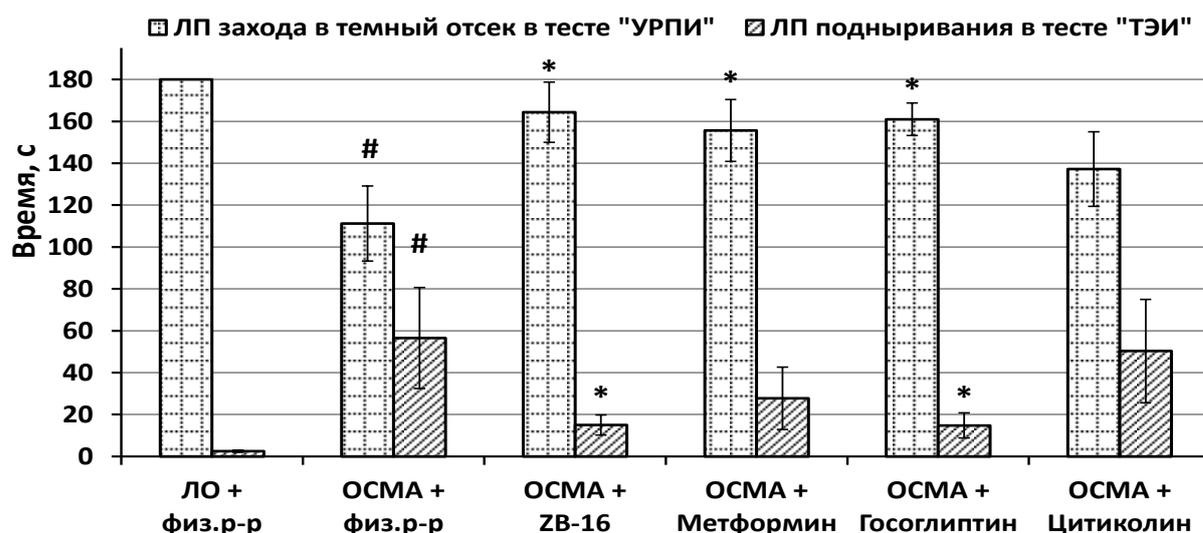
В группе, получавшей соединение ZB-16, по сравнению с контрольной наблюдались значимо большие показатели двигательной активности (на 103%) и ориентировочно-исследовательского поведения (на 218%) (Рис. 19, Рис. 20). Животные данной группы более полно обследовали пространство установки, исследовали норки и часто выполняли стойки. В группах, получающих метформин и гоголиптин наблюдалось значимое повышение двигательной активности и пройденного расстояния, при этом значимое повышение ориентировочно-исследовательской активности наблюдалось в группе

"ОСМА+Госоглиптин" (Рис. 19). В группе "ОСМА+Цитиколин" наблюдалась положительная тенденция, не достигающая уровня статистической значимости.

#### 4.6. Оценка когнитивного дефицита в тестах ТЭИ и УРПИ

Тесты УРПИ и ТЭИ предназначены для оценки сохранности памятного следа у животных с поражением ГМ. В нашем исследовании тестирование предварительно обученных животных в установках УРПИ и ТЭИ выполнялось через 48 часов после моделирования ОСМА.

В группе "ОСМА+физ.р-р" животные значительно чаще и быстрее, после помещения в установку заходили в темный отсек в тесте УРПИ, а также значимо больше времени затрачивали на решение экстраполяционной задачи в ТЭИ (Рис. 21).



**Рис. 21.** Латентный период захода в темный отсек в тесте УРПИ и латентный период подныривания в тесте ТЭИ у животных с фокальной ишемией ГМ на фоне сахарного диабета.

*Примечание:* «ЛО+физ.р-р» – ложно-оперированные интактные животные; «ОСМА+физ.р-р» – группа с окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА) без лечения; # – различия достоверны относительно группы «ЛО+физ.р-р» при  $p < 0,05$ ; \* – различия достоверны относительно группы «ОСМА+физ.р-р» при  $p < 0,05$  (критерий Дана).

В группах, получавших курсом соединение ZB-16, а также гипогликемические препараты, наблюдалось значимое сопоставимое повышение латентного периода захода в темный отсек в тесте УРПИ. В ТЭИ

значимое сопоставимое снижение латентного периода подныривания наблюдалось в группах "ОСМА+ZB-16" и "ОСМА+Госоглиптин", в то время, как в группе "ОСМА+Цитиколин" ЛП захода в темный отсек в тесте УРПИ и время, затраченное на решение задачи в ТЭИ значимо не отличалось от таковых в контрольной группе "ОСМА+физ.р-р".

#### 4.7. Оценка объема инфаркта и степени отека ГМ у животных с фокальной ишемией на фоне сахарного диабета

Наблюдаемый психоневрологический дефицит у животных с фокальной ишемией безусловно является следствием инфаркта части ткани ГМ в зоне кровоснабжения средней мозговой артерии. При этом тяжесть течения ишемии определяет размер некротизированной зоны, на который разнонаправленно влияют множество факторов: функциональное состояние эндотелия, в том числе в сосудах, обеспечивающих коллатеральный кровоток, баланс про- и антикоагулянтных факторов в системе гемостаза, реологическое состояние крови и др.

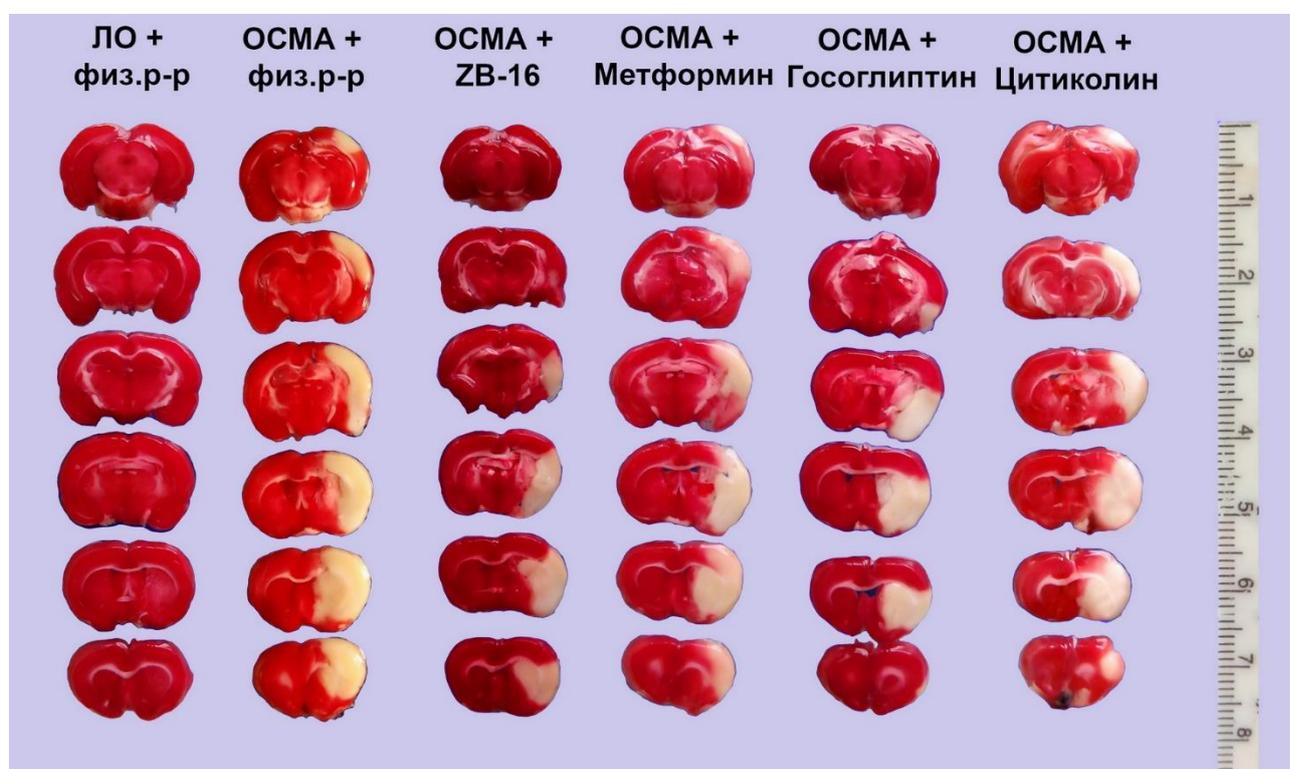
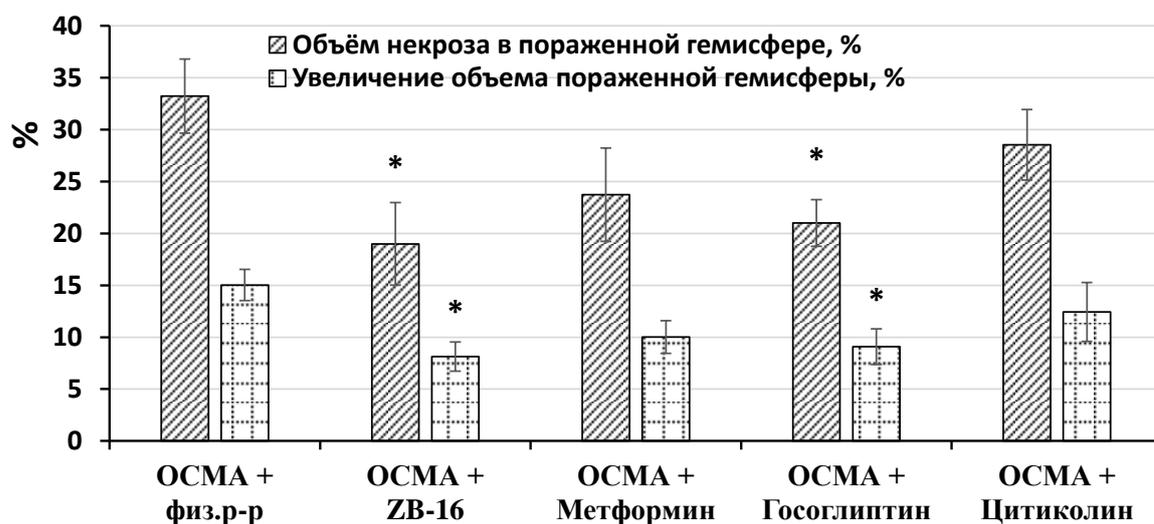


Рис. 22. Срезы головного мозга (толщина 2 мм, окраска: 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид 1%)

Через 48 часов после окклюзии СМА, после эвтанази забирали мозг и проводили анализ фотографий срезов ГМ, окрашенных 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом. Рассчитывался относительный объем некроза и увеличение объема пораженной гемисферы. В контрольной группе животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД ("ОСМА+физ.р-р"), не получавшей гипогликемическую терапию, через 48 часов после 30 минутной окклюзии СМА объем некроза составлял  $33,2 \pm 3,6\%$  от объема пораженной гемисферы которая при этом, вследствие отека, была увеличена на 15% относительно интактной (Рис. 22, Рис. 23).

В группе животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, получавших в течение 4-х недель агонист GPR119, соединение ZB-16 объем некроза, рассчитанный относительно объема пораженной гемисферы был равен  $19,0 \pm 3,9\%$ , что было на 43% меньше ( $p < 0,05$ ), чем в контрольной группе без лечения (Рис. 22, Рис. 23). При этом относительное увеличение объема пораженной гемисферы, которое характеризует степень отека, в группе "ОСМА+ZB-16" было на 46% ниже ( $p < 0,05$ ), чем в группе "ОСМА+физ.р-р". В группе, получавшей в течение 4-х недель препарат сравнения госоглиптин, относительный размер инфаркта и увеличение объема пораженной гемисферы были соответственно ниже на 37% и 40%. В то же время в группе, получавшей в течение 4-х недель метформин наблюдалась тенденция к снижению относительного размера инфаркта и объема пораженной гемисферы, не достигающая статистической значимости по сравнению с группой "ОСМА+физ.р-р". При этом в группе животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД без гипогликемической терапии, но получавшей препарат цитиколин после ОСМА относительный размер инфаркта и объем пораженной гемисфер практически не отличались от таковых в контрольной группе.



**Рис. 23. Объем некроза и увеличение объема поражённой гемисферы у животных с ОСМА на фоне сахарного диабета.**

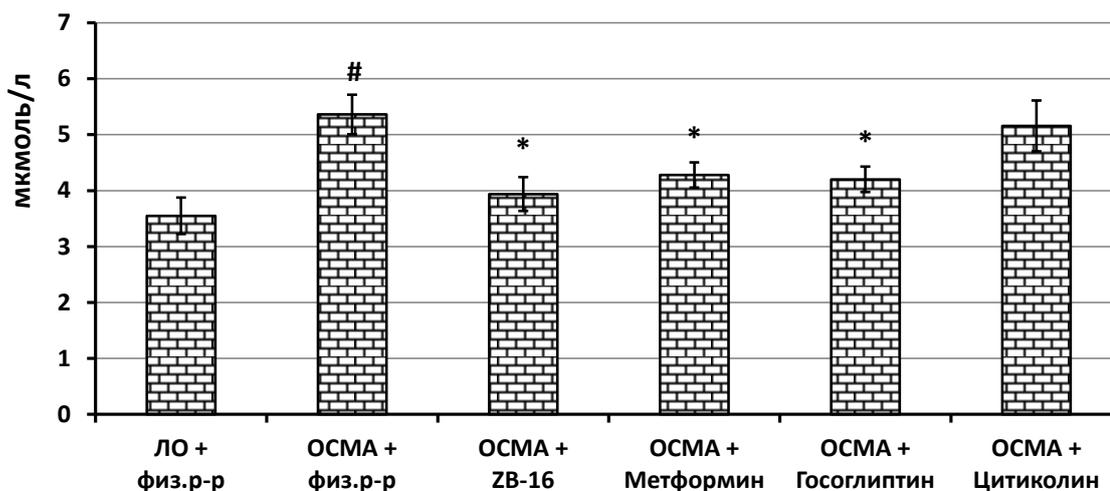
*Примечание: «ОСМА+физ.р-р» – группа с окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА) без лечения; \* – различия достоверны относительно группы «ОСМА+физ.р-р» при  $p < 0,05$  (критерий Дана).*

#### **4.8. Оценка содержания ТБК-активных продуктов у животных с фокальной ишемией ГМ на фоне сахарного диабета**

При сахарном диабете повышается интенсивность ПОЛ и происходит накопление ТБК-активных продуктов в крови [Аметов А.С., 2016; Потемкин В.В., 2015]. При моделировании ишемии ГМ на фоне диабета, можно ожидать увеличение содержания продуктов ПОЛ в плазме вследствие повышения образования свободных радикалов, апоптоза и некроза клеток в зоне ишемии.

У животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, не получавших гипогликемическую терапию, содержание ТБК-активных продуктов в плазме крови через 48 часов после моделирования ОСМА превышало на 70% содержание ТБК-АП у ложно-оперированных интактных животных (Рис. 24). Напротив, в группах, получавших соединение ZB-16, метформин и гогоглиптин, концентрация ТБК-активных продуктов была статистически значимо ниже, чем в контрольной на 27%, 20% и 22% соответственно. При этом послеоперационное введение цитиколина животным со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, не получавшим

гипогликемическую терапию, не привело к значимому снижению ТБК-активных продуктов.



**Рис. 24. Концентрация ТБК-активных продуктов в плазме крови животных с ОСМА на фоне сахарного диабета.**

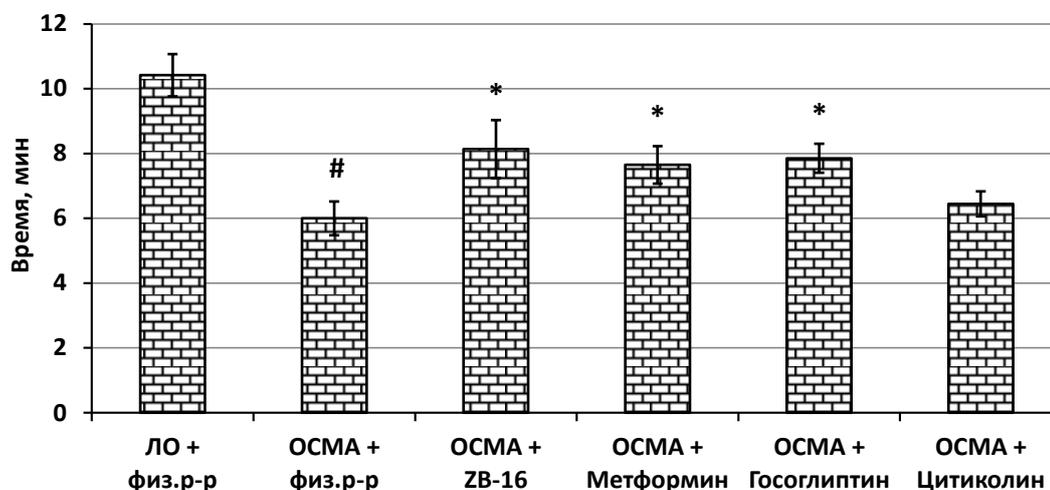
*Примечание:* «ЛО+физ.р-р» – ложно-оперированные интактные животные; «ОСМА+физ.р-р» – группа с окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА) без лечения; # – различия достоверны относительно группы «ЛО+физ.р-р» при  $p < 0,05$ ; \* – различия достоверны относительно группы «ОСМА+физ.р-р» при  $p < 0,05$  (критерий Дана).

#### **4.9. Оценка кислотной резистентности эритроцитов у животных с фокальной ишемией ГМ на фоне сахарного диабета**

При повышении интенсивности свободно-радикальных процессов мембрана эритроцитов подвергается деструктивным изменениям и наблюдается снижение кислотной устойчивости эритроцитов [Рабаданова А.И., 2013]. Можно предположить, что снижение устойчивости мембраны эритроцитов будет отражать интенсивность ПОЛ при ишемическом поражении ГМ.

Спустя 48 часов после моделирования фокальной ишемии, при оценке кислотной резистентности эритроцитов, в контрольной группе наблюдалось значимое сокращение времени гемолиза на 42% по сравнению с группой ложно-оперированных животных (Рис. 25). В группах, получавших соединение ZB-16, метформин и госоглиптин, наблюдалось значимое повышение продолжительности кислотного гемолиза, которая превышала таковую в контрольной группе на 36%, 28% и 31% соответственно. У животных со

стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД без гипогликемической терапии и которые получали цитиколин, продолжительность гемолиза практически не отличалось от таковой в контрольной группе.



**Рис. 25. Продолжительность кислотного гемолиза эритроцитов у животных с ОСМА на фоне сахарного диабета.**

*Примечание:* «ЛО+физ.р-р» – ложно-оперированные интактные животные; «ОСМА+физ.р-р» – группа с окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА) без лечения; # – различия достоверны относительно группы «ЛО+физ.р-р» при  $p < 0,05$ ; \* – различия достоверны относительно группы «ОСМА+физ.р-р» при  $p < 0,05$  (критерий Дана).

## Заключение

Сахарный диабет значительно осложняет течение ишемии ГМ, что очевидно является следствием развивающейся эндотелиальной дисфункции, снижения реактивности сосудов головного мозга и устойчивости ткани ГМ к ишемии [Волчегорский, И.А., 2016]. При моделировании фокальной ишемии, у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД (уровень тощаковой гликемии находился в пределах 8-16 ммоль/л) нами было обнаружено, что 1 часовая окклюзия СМА вызывает гибель 80% крыс с сахарным диабетом, в то время как 30 минутная окклюзия СМА вызвала гибель 40% животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД. При этом у интактных животных после аналогичной по длительности (30 минут) окклюзии СМА наблюдался значительно менее выраженный неврологический дефицит.

Введение агониста рецептора GPR119 в течение 28-ми дней (1 раз в день перорально, в дозе 1 мг/кг) до моделирования фокальной ишемии головного мозга, а затем 2-х дневная терапия после создания ОСМА (через 24 и 48 в дозе 10 мг/кг) приводила к достоверно меньшему объему инсульта и выраженности психоневрологического дефицита у выживших животных. У них по сравнению с контрольной группой были менее выражены симптомы одностороннего повреждения ГМ (шкала Garcia), а физическая выносливость (шкала Combs и D'Alecy, тест «Ротарод») и когнитивные функции (тесты УРПИ и ТЭИ) были лучше. В тоже время размер некроза и степень отека головного мозга, содержание ТБК-активных продуктов в крови у этих животных были ниже, при повышении кислотной резистентности эритроцитов.

Лечебно-профилактическое введение метформина и гогоглиптина животным со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД в меньшей мере, чем соединения ZB-16 способствовало снижению тяжести течения ишемии ГМ при окклюзии СМА. Необходимо отметить, что лечебное введение цитиколина при ОСМА без предшествующей (сопутствующей) гипогликемической терапии, не оказывало церебропротекторное действие.

Известно, что плеiotропные свойства ГПП-1 лишь частично связаны с их гипогликемическим действием, а их основой является широкая распространенность рецептора к ГПП-1 в разных тканях и его способность запускать важнейшие внутриклеточные сигнальные каскады, поддерживающие функциональную активность клетки и ингибирующие апоптоз в патологических условиях [Аметов А.С., 2014а; Власов Т.Д., 2016; Сухарева О.Ю., 2012]. Способность инкретиномиметиков снижать размер инфаркта ткани мозга и выраженность неврологического дефицита, а также ускорять восстановление пораженной ткани и когнитивных функций при их лечебно-профилактическом введении показано во многих экспериментальных исследованиях [Власов Т.Д., 2016; Симаненкова А.В., 2014; Darsalia V., 2014а,б; Gonçalves A., 2016; Ma M., 2015; Yang D., 2013].

## **ГЛАВА 5. Определение механизмов церебропротекторного действия агониста рецептора GPR119– соединения ZB-16**

### **5.1. Исследование противодиабетического действия агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16 у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД**

Сахарный диабет 2 типа – хроническое заболевание, которое часто длительное время протекает бессимптомно и в основном манифестируется после 40 лет. Эффективное его лечение требует комплексного этиологического и патогенетического лечения, включающего изменение образа жизни пищевых привычек, увеличение физической активности и обязательное включение медикаментозной терапии. В подавляющем большинстве случаев фармакотерапия является единственным средством, удовлетворяющим пациента и способным в какой-то степени скомпенсировать нарушение углеводного обмена и патологических процессов связанных с его дисбалансом [Дедов И.И., 2015а,б; Сунцов Ю.И., 2012].

Агонисты рецептора GPR119 в настоящее время рассматриваются, как противодиабетические средства с инкретиновой активностью, предназначенные для длительного перорального приема при СД 2 типа в моно- и комбинированной терапии. Опираясь на результаты предыдущих *in vitro* исследований соединения ZB-16 [Chafeev M.A., 2015], с учетом выявленной агонистической активности к рецептору GPR119, в нашем исследовании мы оценили его гипогликемическое действие при курсовом (28 дней) введении животным со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД в трех дозах (0,1, 1 и 10 мг/кг). На завершающем этапе эксперимента оценивалась способность соединения повышать секрецию ГПП-1 и инсулина при пероральной глюкозной нагрузке.

### ***5.1.1. Исследование гипогликемической активности ZB-16 при курсовом введении в разных дозах***

При моделировании стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД, у животных спустя 3 дня наблюдалось значительное повышение уровня тощачковой гликемии, в эксперимент выбирались животные с уровнем глюкозы в пределах 8-16 ммоль/л, которые в соответствии с принципом рандомизации, распределялись по опытным группам. До начала лечения средний уровень гликемии в группах с диабетом (n=12) был в пределах от 13,0 до 13,4 ммоль/л, что значительно превышало таковой у интактных животных.

Пероральный тест на толерантность к глюкозе (ПТТГ) широко применяется в эндокринологии для диагностики сахарного диабета и позволяет выявить состояние преддиабета, которое характеризуется умеренной декомпенсацией островкового аппарата поджелудочной железы [Ленская К.В., 2011]. Проведение пероральной глюкозной нагрузки помогает оценить функциональное состояние панкреатического аппарата по степени повышения постпрандиальной гликемии и ее уровню через 2 часа после глюкозной нагрузки.

Через 14 дней после начала лечения, во время проведения ПТТГ уровень гликемии в контрольной группе через 30 минут повысился на 117% и спустя 2 часа оставался на высоком уровне, превышая исходный на 36% (Таблица 7). В группах, получавших в течение 2х недель соединение ZB-16 в дозах 1 и 10 мг/кг, а также метформин и глосглиптин наблюдалось менее выраженное повышение гликемии и меньший ее уровень через 2 часа относительно исходного: +5%, +9%, +2% и +8% соответственно. В группе, получавшей ZB-16 в дозе 0,1 мг/кг наблюдалась тенденция к снижению уровня гликемии после глюкозной нагрузки, но менее выраженная по сравнению с таковой в группе, получавшей соединение ZB-16 в дозе 1 мг/кг.

**Таблица 7. Показатели гликемии (ммоль/л) у крыс со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД при проведении перорального теста на толерантность к глюкозе на 14-е сутки после начала лечения.**

Группа	Перед ПТТГ, 0 мин	Время после введения глюкозы per os (изменение уровня гликемии относительно исходного, %)		
		30 мин	60 мин	120 мин
<b>Интакт + физ.р-р</b>	4,2±0,3 (0%)	5,8±0,5 (+38%)	5,8±0,3 (+38%)	4,3±0,3 (+2%)
<b>СД + физ.р-р</b>	11,7±0,6 <sup>#</sup> (0%)	25,4±1,2 <sup>#</sup> (+117%)	22,4±0,9 <sup>#</sup> (+91%)	15,9±0,7 <sup>#</sup> (+36%)
<b>СД + ZB-16 (0,1 мг/кг)</b>	10,5±0,6 (0%)	21,0±1,1 (+100%)	<b>17,0±0,7*</b> (+62%)	12,4±0,8 (+18%)
<b>СД + ZB-16 (1 мг/кг)</b>	10,4±0,7 (0%)	20,9±1,4 (+101%)	<b>17,5±0,9*</b> (+68%)	<b>10,9±0,7*</b> (+5%)
<b>СД + ZB-16 (10 мг/кг)</b>	10,3±0,7 (0%)	20,8±1,0 (+102%)	<b>17,4±1,2*</b> (+69%)	<b>11,2±0,9*</b> (+9%)
<b>СД + Метформин</b>	9,7±0,7 (0%)	<b>17,3±1,0*</b> (+78%)	<b>14,6±1,5*</b> (+51%)	<b>9,9±1,5*</b> (+2%)
<b>СД + Госоглиптин</b>	10,9±0,7 (0%)	22,3±1,1 (+105%)	17,8±1,3 (+63%)	<b>11,8±0,8*</b> (+8%)

*Примечание: «Интакт+физ.р-р» – интактная группа животных; «СД+физ.р-р» – животные со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД без лечения; % – изменение относительно исходного уровня; # – различия достоверны относительно группы «Интакт+физ.р-р» при  $p < 0,05$ ; \* – различия достоверны относительно группы «СД+физ.р-р» при  $p < 0,05$  (критерий Дана).*

При проведении ПТТГ через 28 дней после моделирования диабета в группе без лечения также наблюдалось выраженное нарушение толерантности к глюкозе: через 30 минут после глюкозной нагрузки уровень гликемии поднялся на 125% по сравнению с исходным (Таблица 8).

В группах животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, получавших гипогликемическую терапию в течение 28 дней при проведении ПТТГ наблюдался статистически менее выраженный рост гликемии и меньший ее уровень через 2 часа после глюкозной нагрузки (Таблица 8), а также значимо меньшая площадь под кривой «уровень гликемии-время» по сравнению с контрольной группой (Рис. 26). В группе, получавшей ZB-16 в дозе 1 мг/кг и метформин уровень гликемии через 2 часа после

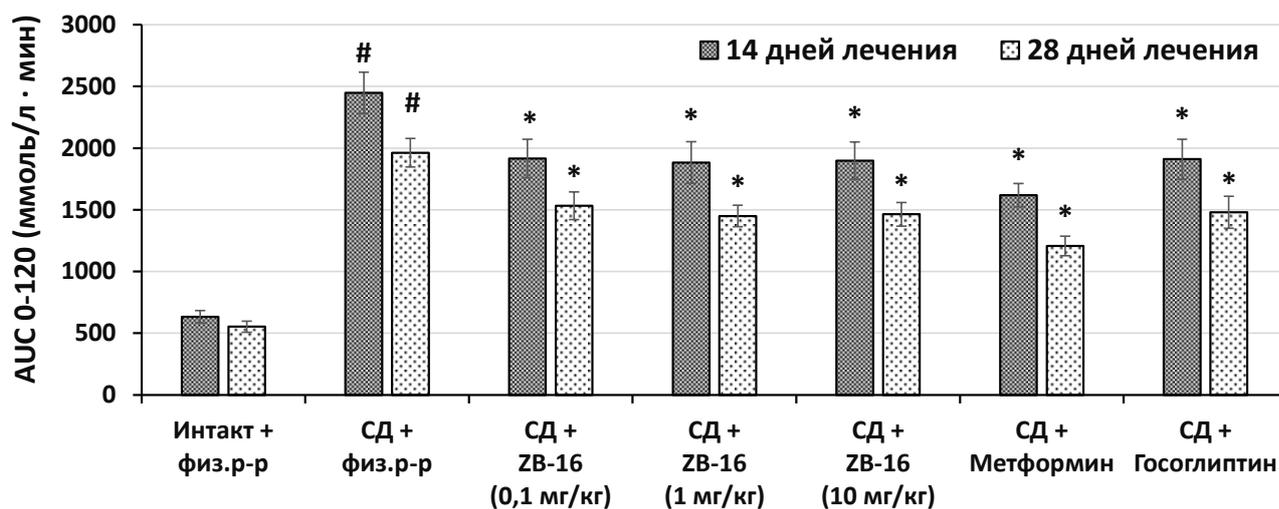
глюкозной нагрузки практически вернулся к исходному уровню и превышал его на 4% и 3% соответственно.

**Таблица 8. Показатели гликемии (ммоль/л) у крыс со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД при проведении перорального теста на толерантность к глюкозе на 28-е сутки после начала лечения.**

Группа	Перед ПТТГ, 0 мин	Время после введения глюкозы per os (изменение уровня гликемии относительно исходного, %)		
		30 мин	60 мин	120 мин
<b>Интакт + физ.р-р</b>	3,7±0,2 (0%)	5,0±0,2 (+35%)	4,9±0,2 (+32%)	3,8±0,1 (+3%)
<b>СД + физ.р-р</b>	9,6±0,5 <sup>#</sup> (0%)	21,6±1,1 <sup>#</sup> (+125%)	16,5±0,3 <sup>#</sup> (+72%)	11,0±0,6 <sup>#</sup> (+15%)
<b>СД + ZB-16 (0,1 мг/кг)</b>	8,4±0,5 (0%)	17,6±0,8 (+110%)	<b>13,2±1,1*</b> (+57%)	9,4±0,6 (+12%)
<b>СД + ZB-16 (1 мг/кг)</b>	7,9±0,4 (0%)	<b>15,7±0,9*</b> (+99%)	<b>13,1±0,8*</b> (+66%)	<b>8,2±0,1*</b> (+4%)
<b>СД + ZB-16 (10 мг/кг)</b>	8,2±0,7 (0%)	<b>16,5±0,8*</b> (+101%)	<b>13,0±1,0*</b> (+59%)	<b>8,7±0,9*</b> (+6%)
<b>СД + Метформин</b>	7,5±0,6 (0%)	<b>12,6±0,8*</b> (+68%)	<b>10,8±1,2*</b> (+44%)	<b>7,7±0,6*</b> (+3%)
<b>СД + Госоглиптин</b>	8,1±0,6 (0%)	<b>16,2±0,9*</b> (+100%)	<b>13,5±1,3*</b> (+67%)	<b>8,8±0,7*</b> (+9%)

*Примечание: «Интакт+физ.р-р» – интактная группа животных; «СД+физ.р-р» – животные со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД без лечения; % – изменение относительно исходного уровня; # – различия достоверны относительно группы «Интакт+физ.р-р» при  $p < 0,05$ ; \* – различия достоверны относительно группы «СД+физ.р-р» при  $p < 0,05$  (критерий Дана).*

При анализе площади под кривой «уровень гликемии-время» ( $AUC_{0-120}$ , ммоль/л\*мин) было отмечено, что через 14 и 28 дней после начала лечения уровень  $AUC_{0-120}$  по сравнению с контрольной группой был значимо ниже во всех опытных группах. При этом, через 28 дней, в группах, получавших ZB-16 в дозе 1 мг/кг и метформин, уровень  $AUC_{0-120}$  был ниже, чем в контрольной группе на 26 и 38% соответственно (Рис. 26). Это может указывать на улучшение толерантности к глюкозе в данных группах, выражающееся в меньшей величине пика роста гликемии и меньшем ее уровне через 2 часа после глюкозной нагрузки.



**Рис. 26.** Площадь под кривой «уровень гликемии-время» при проведении ПТТГ после 2х и 4х недель лечения.

*Примечание:* «Интакт+физ.р-р» – интактная группа животных; «СД+физ.р-р» – животные со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД без лечения; # – различия достоверны по отношению к группе «Интакт+физ.р-р» ( $p < 0,05$ ); \* – различия достоверны по отношению к группе «СД+физ.р-р» ( $p < 0,05$ ) (критерий Дана).

Таким образом, при исследовании гипогликемических свойств агониста рецептора GPR119, соединения ZB-16 при курсовом введении в разных дозах (0,1, 1 и 10 мг/кг) было отмечено, что исследуемое соединение проявляет гипогликемическую активность во всех трех дозах. При этом повышение дозы от 0,1 до 1 мг/кг приводит к росту гипогликемического эффекта, но с дальнейшим ее повышением (до 10 мг/кг), роста эффекта не наблюдается.

При сравнении гипогликемических свойств агониста GPR119 с препаратами сравнения из групп бигуанидов и ингибиторов ДПП-4, отмечено, что соединение ZB-16 уступает по гипогликемической активности метформину, но сопоставимо или незначительно превышает сахароснижающую активность глосглиптина.

### **5.1.2. Изучение влияния соединения ZB-16 на уровень ГПП-1, инсулина и глюкозы в крови при глюкозной нагрузке**

Ключевым механизмом действия агонистов GPR119 является способность независимо от уровня глюкозы стимулировать секрецию

инкретинов, а при повышении уровня гликемии – стимулировать секрецию инсулина [Тюренков И.Н., 2015; Soga T., 2005]. На данном этапе исследования мы оценили способность соединения ZB-16 влиять на уровень инкретинов и инсулина при глюкозной нагрузке:

- у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, которые 4 недели получали ZB-16 (группа «СД+ZB-16»), в сравнении с животными, которые в качестве лечения получали раствор NaCl 0,9% (группа «СД+физ.р-р»);
- у интактных здоровых крыс, которые однократно за 1 час до эксперимента получили ZB-16 (группа «Интакт+ZB-16»), в сравнении с животными, однократно за 1 час до эксперимента получившими раствор NaCl 0,9% (группа «Интакт+физ.р-р»).

Как известно, пик выработки ГПП-1 по результатам разных исследований приходится на 15-20 минут с момента приема глюкозы [Ohlsson L., 2013]. Секреция инсулина происходит в 2 фазы, но поскольку агонисты рецептора GPR119, как и инкретины повышают секрецию инсулина при поступлении глюкозы в бета-клетки, мы посчитали обоснованным одномоментное измерение уровня ГПП-1 и инсулина через 15 минут, после пероральной глюкозной нагрузки.

В группе крыс «СД+физ.р-р» исходный уровень ГПП-1 был меньше на 30%, чем в группе «Интакт+физ.р-р», что говорит о возникновении нарушений в работе системы инкретинов и снижении базальной секреции ГПП-1 у животных через 4 недели после моделирования стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД (Рис. 27А). Однако введение агониста рецептора GPR119 значительно повысило тощаковый уровень ГПП-1 как в группе «СД+ZB-16» при курсовом введении (больше на 121%), так и в группе «Интакт+ZB-16» (больше на 119%), животные которой однократно за 1 час до измерения получили соединение ZB-16.

Известно, что уровень ГПП-1 при незначительной плазменной концентрации натощак (3-5 пмоль/Л) значительно повышается (до 35-50

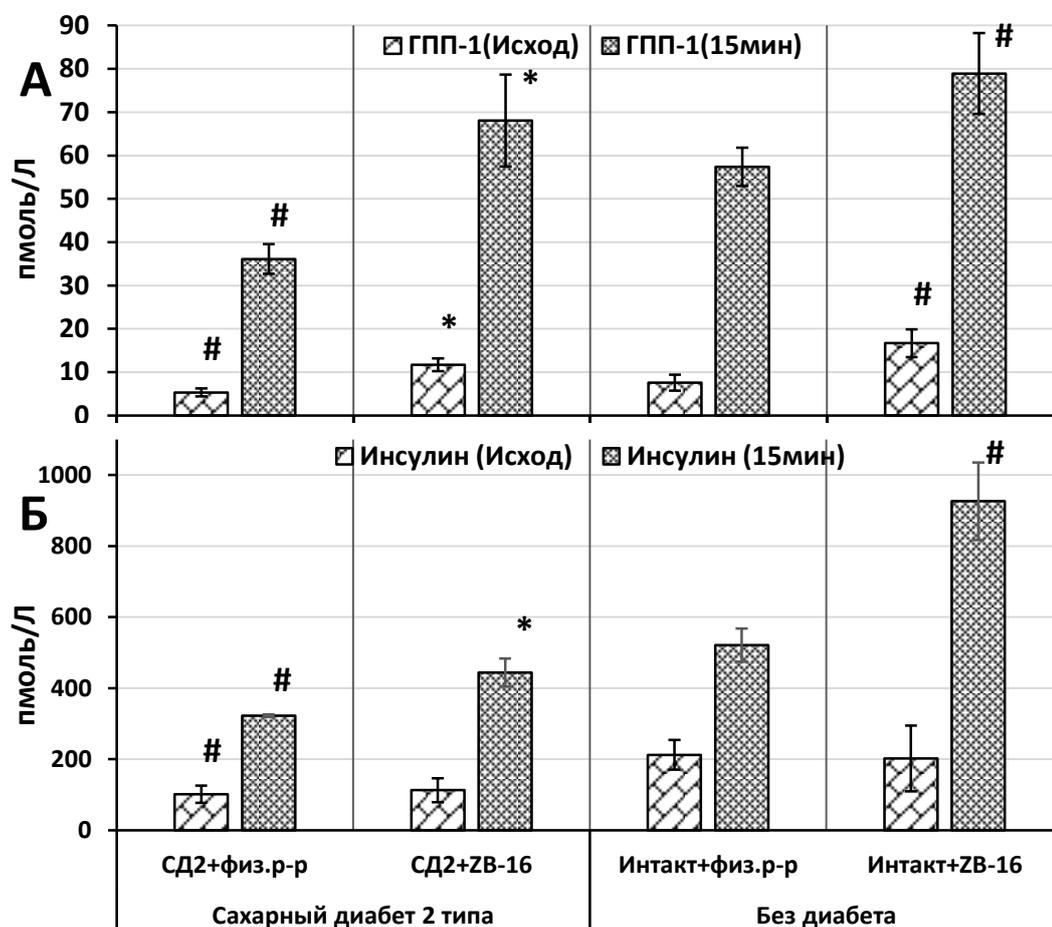
пмоль/л) при поступлении глюкозы и пищи в ЖКТ [Eriksson L., 2015; Messenger B., 2003]. В нашем исследовании пероральное введение глюкозы существенно увеличивало концентрацию ГПП-1 в крови животных всех групп (Рис. 27А). Однако, в группе «СД+физ.р-р» уровень ГПП-1 после подъема был на 37% ниже, чем в группе «Интакт+физ.р-р», что говорит о снижении стимулированной глюкозой секреции ГПП-1 при стрептозотоцин-никотинамид-индуцированном СД без лечения. Тогда как в группе «СД+ZB-16» уровень ГПП-1 после глюкозной нагрузки был всего на 14% ниже, чем в группе «Интакт+ZB-16», что говорит о меньшем снижении функциональных возможностей инкретиновой системы у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, получавших в течение 4-х недель соединение ZB-16.

В ряде исследований установлено, что агонисты рецептора GPR119 в аддитивной форме усиливают стимулированную глюкозой секрецию инкретинов [Lan H., 2012; Watterson K.R., 2014]. В нашем исследовании в группах предварительно, получавших соединение ZB-16 наблюдалось значительное усиление секреции ГПП-1 как у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, так и у интактных крыс: через 15 минут после глюкозной нагрузки в группе «СД+ZB-16» уровень ГПП-1 был на 90% больше, чем в группе «СД+физ.р-р», а в группе «Интакт+ZB-16» на 38% больше, чем в группе «Интакт+физ.р-р» (Рис. 27А).

До и после (через 15 минут) глюкозной нагрузки мы также оценивали уровень инсулина и гликемии в крови у исследуемых групп. Известно, что физиологическим действием инкретинов обусловлено до 50-70% постпрандиальной секреции инсулина. Однако агонисты рецептора GPR119 помимо инкретинопосредованной стимуляции секреции инсулина также способны напрямую стимулировать дегрануляцию бета-клеток при повышении уровня глюкозы в крови [Lan H., 2012].

В группе «Интакт+физ.р-р» тощачовый уровень инсулина в 2 раза превышал таковой в группе «СД+физ.р-р», а в группе «СД+ZB-16» он был

незначимо выше, по сравнению с группой «СД+ZB-16» (на 11%). В группах «Интакт+физ.р-р» и «Интакт+ZB-16» уровень инсулина до глюкозной нагрузки практически не отличался (Рис. 27Б).



**Рис. 27.** Влияние агониста GPR119 на уровень ГПП-1 (А) и инсулина (Б) при глюкозной нагрузке у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД и животных без диабета (n=11).

*Примечание:* «Интакт+физ.р-р» – интактная группа животных; «СД+физ.р-р» – животные со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД; # – различия достоверны по отношению к группе «Интакт+физ.р-р» ( $p < 0,05$ ); \* – различия достоверны по отношению к группе «СД+физ.р-р» ( $p < 0,05$ ) (*t* критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони).

При оценке уровня инсулина в крови через 15 минут после пероральной нагрузки глюкозой во всех исследуемых группах наблюдался подъем. Однако, в группе «СД+ZB-16» уровень инсулина был на 38% выше, чем в группе «СД+физ.р-р». У интактных животных предварительное введение ZB-16 вызвало более значительный прирост: уровень инсулина в группе «Интакт+ZB-

16» ( $0,926 \pm 0,11$  нмоль/л,  $p < 0,01$ ) был на 78% выше, чем в группе «Интакт+физ.р-р» ( $0,521 \pm 0,047$  нмоль/л).

Таким образом, агонист рецептора GPR119– соединение ZB-16 после курсового введения животным со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД и при однократном введении интактным животным значительно (более чем в 2 раза) повышает тощаковый уровень ГПП-1. При пероральной глюкозной нагрузке уровень ГПП-1 возрос почти в 2 раза (на 90%) у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД при курсовом введении ZB-16, а у интактных животных только на треть (на 38%) при однократном введении. Уровень инсулина при этом в группе «СД+ZB-16» был на 38% выше, чем в группе «СД+физ.р-р», а у интактных животных данная разница составила 78%.

В результате проведенного исследования было установлено, что соединение ZB-16 проявляет выраженную гипогликемическую активность уже в дозе 1 мг/кг, которая не увеличивается при повышении дозы до 10 мг/кг. При исследовании механизмов гипогликемического действия соединения ZB-16 было показано, что после введения соединения ZB-16 у животных с и без диабета наблюдается значительное повышение базального (тощакового) уровня ГПП-1 (более, чем в 2 раза), а при глюкозной нагрузке соединение ZB-16 значимо увеличивает выработку ГПП-1 и инсулина как у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, так и у интактных крыс.

## **5.2. Исследование функционального состояния эндотелия и параметров гемостаза у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, получавших агонист рецептора GPR119**

Риск развития сосудистых осложнений при сахарном диабете и тяжесть их течения обусловлен не только нарушением углеводного обмена, но и нарушением эндотелиальных функций, вазодилатации, агрегации и свертывания крови и др. [Тюренок, И.Н., 2013а; Eriksson L., 215]. Поэтому уже на стадии доклинических исследований нового противодиабетического

препарата целесообразно оценить его влияние на патогенетические процессы, которые лежат в основе развития микро- и макроангиопатии при сахарном диабете, а также имеют значимое влияние при ОНМК.

На заключительном этапе исследования, описанного в главе 5.1. (стр.86), были оценены функциональное состояние эндотелия и параметры коагуляционного и тромбоцитарного гемостаза у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, получавших соединение ZB-16 (1 мг/кг) и препараты сравнения в течение 4-х недель. Были оценены функциональное состояние эндотелия (изменения уровня мозгового кровотока при стимуляции синтеза NO и блокаде базальной секреции NO), а также были определены параметры коагуляционного и тромбоцитарного гемостаза (АЧТВ, протромбиновое время, тромбиновое время, плазменная концентрация фибриногена, а также степень и скорость агрегации тромбоцитов).

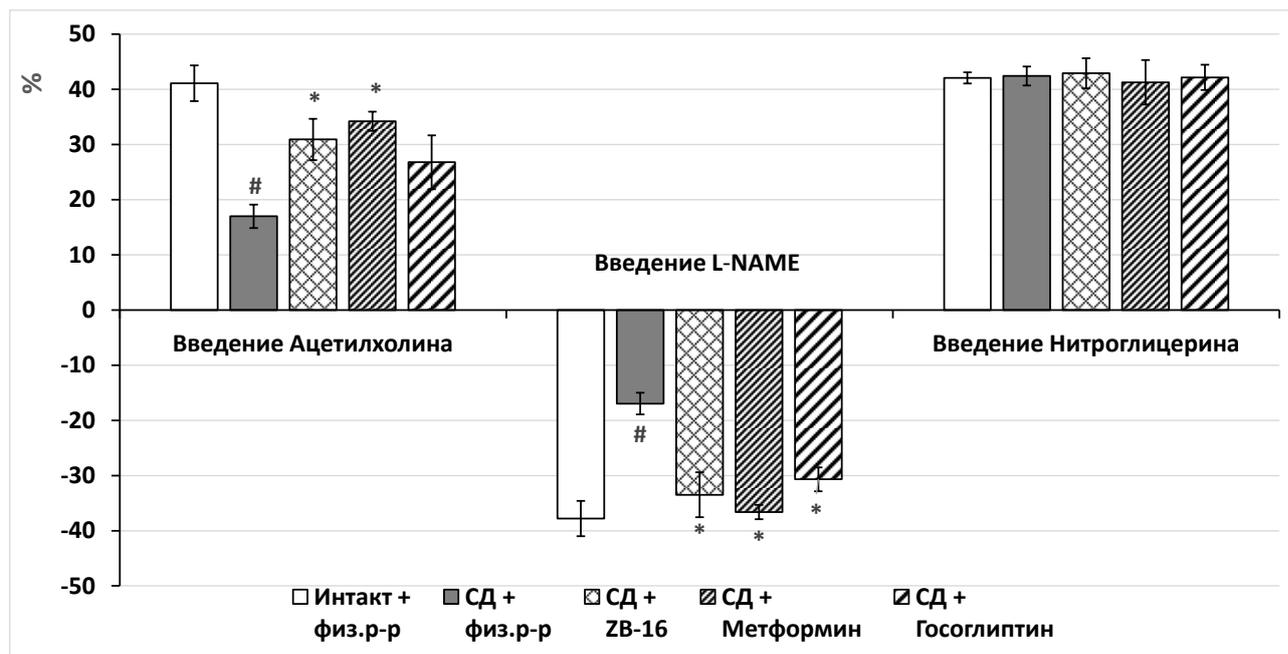
### ***5.2.1. Исследование функционального состояния эндотелия у животных с экспериментальным СД, получавших агонист рецептора GPR119***

В данном исследовании мы использовали комплексный подход оценки функционального состояния эндотелия, который заключается в введении модификаторов синтеза оксида азота (ацетилхолин, нитро-L-аргинин) [Тюренков И.Н., 2008].

На первом этапе оценки функционального состояния эндотелия животным вводили ацетилхолин, который стимулирует выработку оксида азота, при этом фиксировалось изменение уровня мозгового кровотока (МК) относительно исходного. Введение ацетилхолина животным, получавшим на фоне экспериментального сахарного диабета в течение 4-х недель соединения ZB-16 и метформин вызывало увеличение кровотока на 31% и 34% соответственно, что было выше по сравнению с приростом уровня кровотока в группе, не получавшей гипогликемическую терапию – 17% ( $p < 0,05$ ) (Рис. 28).

На втором этапе оценки функционального состояния эндотелия оценивалась базальная секреция NO, по относительному уровню падения

мозгового кровотока при введении неспецифичного блокатора синтазы оксида азота (L-NAME). При введении животным нитро-L-аргинина, более выражено МК снижался в группах, получавших метформин (-37%), исследуемое соединение (-33%) и гогоглиптин (-31%), по сравнению с группой без гипогликемической терапии. Ответ на введение нитроглицерина во всех группах был примерно одинаков, а разница между значениями не превышала 2-4% (Рис. 28).



**Рис. 28. Исследование функционального состояния эндотелия у животных с сахарным диабетом после 4-х недельного лечения.**

*Примечание: «Интакт+физ.р-р» – интактная группа животных; «СД+физ.р-р» – животные со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД без лечения; # – различия достоверны по отношению к группе «Интакт+физ.р-р» ( $p < 0,05$ ); \* – различия достоверны по отношению к группе «СД+физ.р-р» ( $p < 0,05$ ) (критерий Дана).*

Эти данные свидетельствуют о снижении стимулируемой и базальной продукции NO при стрептозотоцин-никотинамид-индуцированном СД у контрольной группы животных, не получавшей гипогликемической терапии. При этом введение агониста GPR119, метформина и ингибитора ДПП-4 в течение 28 дней, способствует в значительной степени восстановлению функционального состояния эндотелия у животных с сахарным диабетом.

### ***5.2.2. Исследование параметров коагуляционного гемостаза у животных с экспериментальным СД, получавших агонист рецептора GPR119***

В плазменном (коагуляционном) механизме свертывания крови, итогом которого является образование фибрина, основная роль принадлежит плазменным факторам (фибриноген, протромбин и др.). Первая фаза плазменного гемостаза – образование протромбиназы. Показателем, характеризующим первую фазу плазменного гемостаза, является активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) [Северина А.С., 2004; Спасов А.А., 2010].

По результатам проведенного исследования в группе животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД без лечения наблюдается достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение АЧТВ на 38% по отношению к группе интактных животных, что свидетельствует о нарушениях в системе внутреннего каскада свертывания плазмы (Рис. 29А).

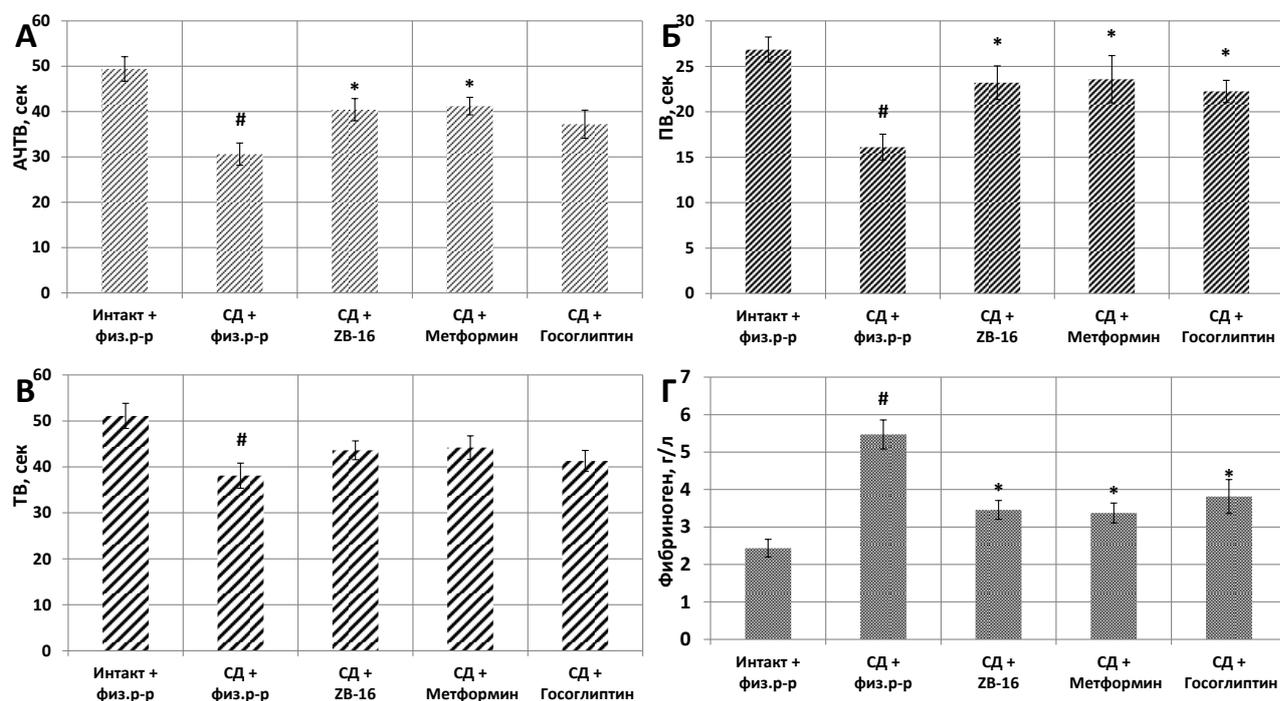
В группе животных, получавших в качестве лечения соединение ZB-16 и метформин наблюдалось значимое удлинение АЧТВ на 26% и 24% по сравнению с АЧТВ в контрольной группе без лечения, однако в группах, получавших ZB-16 и метформин длительность АЧТВ оставалась меньше, чем у интактных животных (Рис. 29А).

Вторая фаза плазменного гемостаза – тромбинообразование. В эту фазу протромбиназа вместе с факторами коагуляции V, VII, X и IV переводит неактивный протромбин в активную форму – тромбин. Показателем, характеризующим вторую фазу, является протромбиновое время (ПВ) (Рис. 29Б).

У группы животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД без лечения по сравнению с группой интактных отмечалось достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение протромбинового времени (ПВ) на 40%, что свидетельствует о снижении антикоагуляционного потенциала.

По сравнению с группой без лечения, во всех группах, получавших лечение (ZB-16, метформин и госоглиптин), значения ПВ были значимо выше.

В группе животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, получавшей ZB-16 значения ПВ было выше на 44%, метформин – 46% и гогоглиптин на 38%, чем в группе без лечения (Рис. 29Б).



**Рис. 29. Основные показатели коагуляционного гемостаза у животных с сахарным диабетом после 4-х недельного введения соединения ZB-16 и препаратов сравнения. (А) АЧТВ; (Б) протромбиновое время; (В) тромбиновое время; (Г) уровень фибриногена.**

*Примечание: «Интакт+физ.р-р» – интактная группа животных; «СД+физ.р-р» – животные со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД без лечения; # – различия достоверны по отношению к группе «Интакт+физ.р-р» ( $p < 0,05$ ); \* – различия достоверны по отношению к группе «СД+физ.р-р» ( $p < 0,05$ ) (критерий Дана).*

Третья фаза – фибринообразование. Показателем, характеризующим третью фазу, является тромбиновое время и концентрация фибриногена в плазме. Тромбиновое время характеризует конечный этап процесса свертывания – превращение фибриногена в фибрин под действием тромбина.

В условиях сахарного диабета и развивающейся на его фоне эндотелиальной дисфункции наблюдается достоверное укорочение тромбинового времени (ТВ) у животных с диабетом без фармакологической поддержки на 25%, по сравнению с интактными, что также свидетельствует об усилении прокоагуляционных сдвигов в системе гемостаза. Под влиянием

терапии, в опытных группах наблюдалась тенденция к нормализации ТВ, по сравнению с контрольной группой без лечения (Рис. 29В).

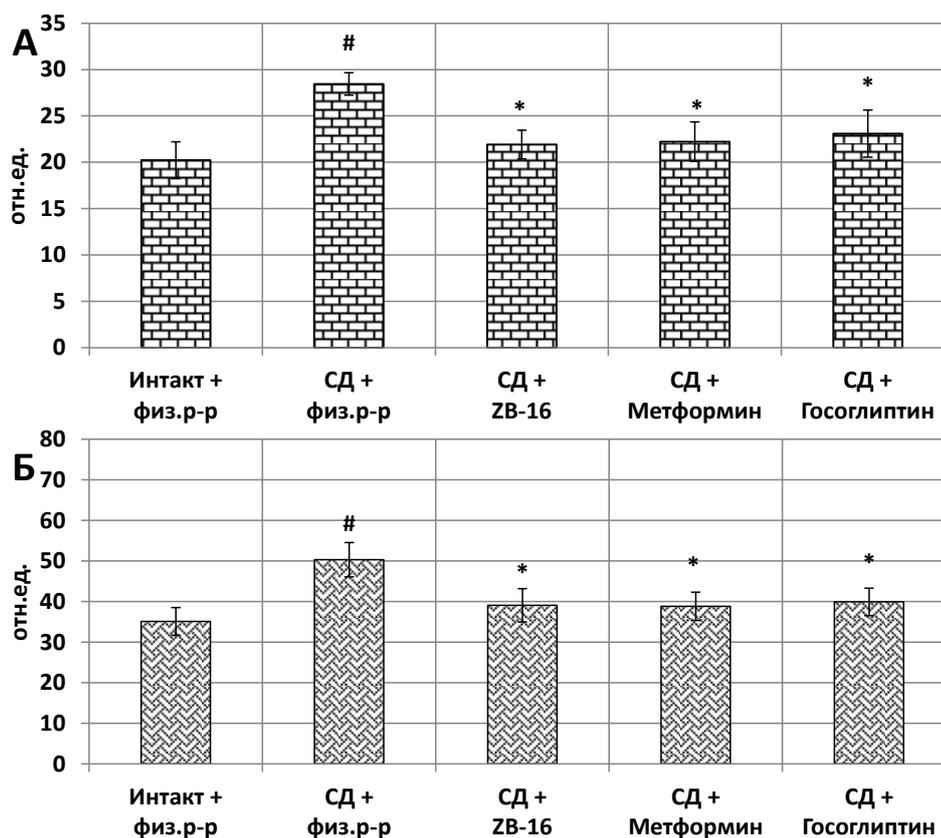
В группе животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД наблюдалось достоверное увеличение уровня фибриногена в плазме крови на 125% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой интактных животных, что подтверждает наличие нарушений в системе плазменного гемостаза (повышение образования сгустка фибрина на последней стадии свертывания крови) (Рис. 29Г). Концентрация фибриногена является одним из показателей, характеризующих третью фазу образования тромба – фибринообразование. Кроме того, фибриноген является одним из белков «острой фазы», концентрация которых повышается при нарушениях системы гемостаза и острых воспалениях.

В группах животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, получавших в качестве лечения соединения ZB-16, метформин и глосглиптин концентрация фибриногена была значимо меньше чем в группе животных с сахарным диабетом без лечения: ниже на 37%, 38% и 30% соответственно (Рис. 29Г).

### ***5.2.3. Исследование параметров тромбоцитарного компонента гемостаза у животных с экспериментальным СД, получавших агонист рецептора GPR119***

У животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, не получавших лечения происходило значимое повышение степени агрегации (на 41%) и скорости агрегации тромбоцитов (на 43%) (Рис. 30).

Во всех группах животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, получавших гипогликемическую терапию, наблюдалась сопоставимая нормализация параметров тромбоцитарного компонента гемостаза (Рис. 30).



**Рис. 30. Основные показатели тромбоцитарного гемостаза у животных с сахарным диабетом после 4-х недельного введения соединения ZB-16 и препаратов сравнения. Степень (А) и скорость (Б) агрегации тромбоцитов.**

*Примечание: «Инттакт+физ.р-р» – интактная группа животных; «СД+физ.р-р» – животные со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД без лечения; # – различия достоверны по отношению к группе «Инттакт+физ.р-р» ( $p < 0,05$ ); \* – различия достоверны по отношению к группе «СД+физ.р-р» ( $p < 0,05$ ) (критерий Дана).*

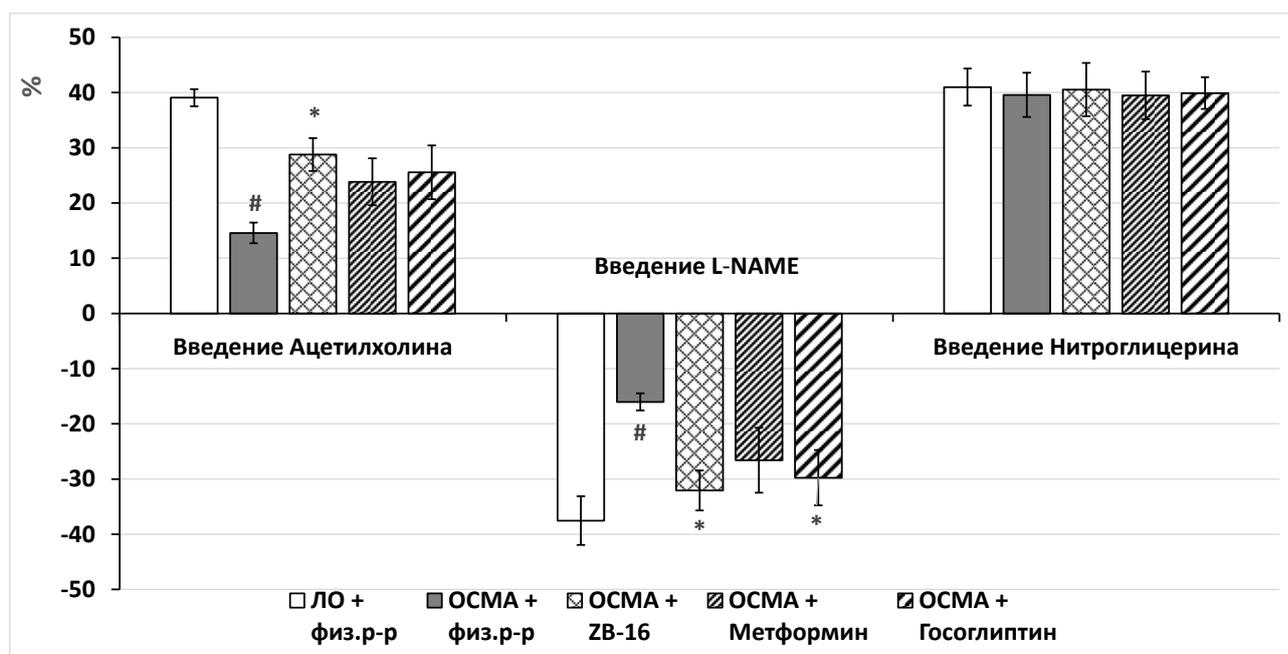
### **5.3. Исследование функционального состояния эндотелия и параметров гемостаза у животных с ишемией ГМ на фоне стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД, получавших агонист рецептора GPR119**

На заключительном этапе исследования, описанного в Главе 4 (стр.68), через 2 суток после моделирования ОСМА, у животных были исследованы функциональное состояние эндотелия и параметры коагуляционного и тромбоцитарного гемостаза.

### ***5.3.1. Исследование функционального состояния эндотелия у животных с ишемией ГМ на фоне сахарного диабета, получавших агонист рецептора GPR119***

В контрольной группе животных, не получавших гипогликемическую терапию, введение ацетилхолина, через 48 часов после моделирования ишемии ГМ не вызывало значительного прироста уровня МК (+15% от исходного уровня), что говорит о выраженных нарушениях стимулированной секреции NO у животных в данной группе. В группах, получавших на фоне стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД в течение 4-х недель соединение ZB-16, введение ацетилхолина вызывало наибольший прирост уровня МК (+29%), при этом в средний прирост МК в группе, получавшей метформин незначительно меньше (+24%), как и в группе, получавшей госоглиптин (+25%) (Рис. 31).

При введении блокатора NO синтазы (нитро-L-аргинина) животным контрольной группы, не получавших гипогликемическую терапию, наблюдалось незначительное снижение уровня МК (-16% от исходного уровня), что говорит о нарушениях базальной секреции NO у данных животных. Более выражено МК снижался в группе, получавшей агонист GPR119 (-32%), в группах, получавших препараты сравнения метформин и госоглиптин, снижение МК было незначительно менее выражено (-27% и 30% соответственно), но также превышало таковое в контрольной группе. Введение нитроглицерина вызывало сопоставимое повышение МК во всех группах (Рис. 31).



**Рис. 31. Исследование функционального состояния эндотелия у животных с ишемией ГМ на фоне сахарного диабета.**

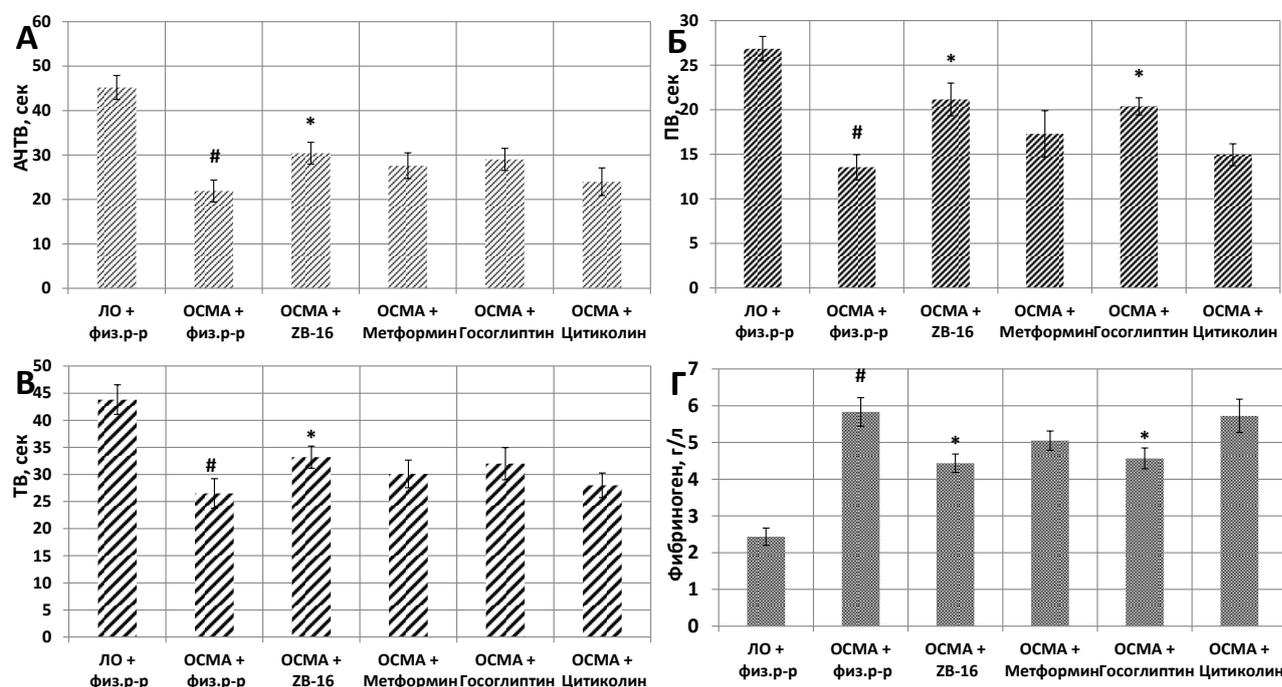
*Примечание:* «ЛО+физ.р-р» – ложно-оперированные интактные животные; «OCMA+физ.р-р» – группа с окклюзией средней мозговой артерии (OCMA) без лечения; # – различия достоверны относительно группы «ЛО+физ.р-р» при  $p < 0,05$ ; \* – различия достоверны относительно группы «OCMA+физ.р-р» при  $p < 0,05$  (критерий Дана).

### **5.3.2. Исследование параметров коагуляционного гемостаза у животных с ишемией ГМ на фоне сахарного диабета, получавших агонист рецептора GPR119**

У животных с ишемией ГМ на фоне стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД, которые не получали гипогликемическую терапию наблюдались значительные нарушения в коагуляционном гемостазе. Длительность АЧТВ, протромбинового и тромбинового времени снизился на соответственно на 52%, 50% и 39%, а концентрация фибриногена выросла практически в 2,5 раза (Рис. 32).

У животных, получавших гипогликемическую терапию в течение 28 дней перед моделированием ишемии ГМ, наблюдаемые нарушения в коагуляционном гемостазе были менее выражены, особенно в группах, получавших агонист GPR119 и ингибитор ДПП-4. В группе, получавшей метформин, на фоне ишемии ГМ наблюдалась тенденция к нормализации

нарушений в коагуляционном гемостазе, не достигающая уровня статистической значимости по сравнению с нарушениями в контрольной группе.



**Рис. 32. Основные показатели гемостаза у животных с ишемией ГМ на фоне сахарного диабета. (А) АЧТВ; (Б) протромбиновое время; (В) тромбиновое время; (Г) уровень фибриногена.**

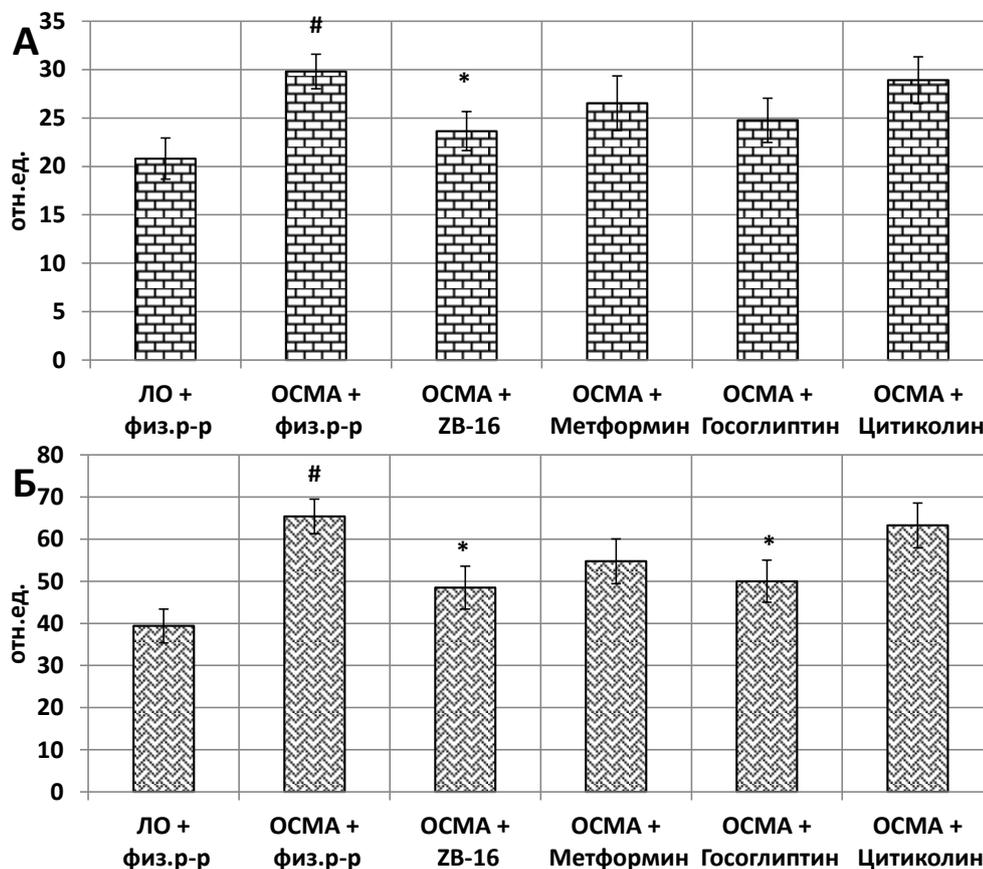
*Примечание:* «ЛО+физ.р-р» – ложно-оперированные интактные животные; «ОСМА+физ.р-р» – группа с окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА) без лечения; # – различия достоверны относительно группы «ЛО+физ.р-р» при  $p < 0,05$ ; \* – различия достоверны относительно группы «ОСМА+физ.р-р» при  $p < 0,05$  (критерий Дана).

### **5.3.3. Исследование параметров тромбоцитарного компонента гемостаза у животных с ишемией ГМ на фоне сахарного диабета, получавших агонист рецептора GPR119**

Через 2 дня после моделирования фокальной ишемии головного мозга на фоне стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД, в группе животных, не получавших лечения наблюдалось значительное повышение степени (на 43%) и скорости агрегации тромбоцитов (на 66%) (Рис. 33).

В группе, получавшей соединение ZB-16 наблюдалось выраженное снижение степени и скорости агрегации тромбоцитов по сравнению с таковыми в контрольной группе (меньше на 21 и 26% соответственно) (Рис. 33). В группе,

получавшей метформин, наблюдалась тенденция к снижению степени и скорости агрегации тромбоцитов, а в группе, получавшей госоглиптин, значительно снизилась скорость агрегации тромбоцитов по сравнению с таковой в контрольной группе (Рис. 33Б)



**Рис. 33. Основные показатели тромбоцитарного гемостаза у животных с ишемией ГМ на фоне сахарного диабета. Степень (А) и скорость (Б) агрегации тромбоцитов.**

*Примечание: «Интакт+физ.р-р» – интактная группа животных; «СД+физ.р-р» – животные со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД без лечения; # – различия достоверны по отношению к группе «Интакт+физ.р-р» ( $p < 0,05$ ); \* – различия достоверны по отношению к группе «СД+физ.р-р» ( $p < 0,05$ ) (критерий Дана).*

## Заключение

Проведенное на животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД исследование показывает, что гипергликемия, связанная с сахарным диабетом, приводит к выраженным нарушениям функционального состояния эндотелия и прокоагулянтным сдвигам в системе гемостаза.

Введение агониста GPR119, метформина и глосглиптина, параллельно со снижением уровня гликемии, приводило к нормализации оцениваемых параметров (стимулированной и базальной секреции NO, а также АЧТВ, ПВ, ТВ и уровня фибриногена). Безусловно это может быть связано с их сахароснижающим эффектом и способностью улучшать постпрандиальный контроль гликемии, при введении на протяжении 28 дней. С другой стороны, для средств, влияющих на систему инкретинов, в литературе отмечена способность оказывать инкретинопосредованное эндотелиотропное действие, что в ряде исследований приводило к замедлению агрегации тромбоцитов [Cameron-Vendrig A., 2016].

Исследуемое соединение в меньшей степени (чем метформин) снижало уровень гликемии, но сопоставимо способствовало сохранению вазодилатирующей функции эндотелия и нормализации параметров коагуляционного гемостаза в условиях экспериментального сахарного диабета. Это дает основание предположить, что гипогликемический эффект соединения ZB-16 – не единственный механизм его предполагаемого эндотелиопозитивного действия. Повышение секреции ГПП-1 у животных, получавших ZB-16, в какой-то части может обеспечивать снижение выраженности эндотелиальной дисфункции у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД.

В нормальных условиях эндотелий играет важное значение в поддержании коагуляционного гемостаза, что связано с секрецией NO, простациклина, тканевого активатора фибринолиза, а также с созданием антикоагуляционного потенциала на границе кровь/ткань путем фиксации на эндотелии комплекса гепарин-антитромбин III. Однако в патологических условиях, таких, как сахарный диабет, при снижении функционального состояния эндотелий способен приобретать тромбогенный потенциал. Так, при гибели эндотелиоцитов обнажается субэндотелий и при контакте с коллагеном происходят активация тромбоцитов и системы свертывания крови [Асташев П.Е., 2011; Хасанова Ю.В., 2013].

Таким образом, на фоне стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД введение соединения ZB-16, метформина и госоглиптина сопоставимо улучшает функциональное состояние эндотелия и способствует нормализации нарушений в коагуляционном гемостазе.

При оценке функционального состояния эндотелия у животных с ишемией ГМ на фоне СД, в контрольной группе наблюдалось значительное снижение эндотелийзависимой вазодилатации и выраженные нарушения параметров коагуляционного гемостаза.

В группах, получавших соединения с инкретиновой активностью (ZB-16 и госоглиптин) наблюдалось улучшение функционального состояния эндотелия по сравнению с контрольной группой, в то время, как в группе, получавшая метформин, наблюдалась лишь тенденция к повышению эндотелийзависимой вазодилатации и нормализации параметров коагуляционного гемостаза.

В клинике показана способность метформина снижать риск развития сердечно-сосудистых осложнений СД, что связывают с выраженной гипогликемической активностью, снижением периферической инсулинорезистентности и улучшением липидного профиля. Однако в литературе нет однозначных данных о его непосредственном влиянии на течение ОНМК в острый период [Jia J., 2015; Li J., 2010]. Наблюдаемая тенденция к уменьшению размера инфаркта, снижения некоторых показателей неврологического дефицита, содержания ТБК-активных продуктов и повышение длительности кислотного гемолиза может быть следствием эффективного контроля гликемии на всем протяжении эксперимента у данных животных.

Для средств с инкретиновой активностью, к которым относится госоглиптин и к которым можно отнести агонист рецептора GPR119, эндотелиопротекторный эффект по литературным данным реализуется благодаря способности (через сигнальные пути GPP-1P/PI3K/PKB, GPP-1P/AЦ/РКА) модулировать активность eNOS, снижать экспрессию эндотелиоцитами адгезивных белков (VCAM-1 и ICAM-1) и хемоаттрактантов

(MCP-1 и TNF $\alpha$ ), которые отвечают за активацию и накопление иммунных клеток в сосудистой стенке [Оскола, Е.В., 2013; Сухарева О.Ю., 2012; Anagnostis P., 2011; Eriksson L., 2015], что является одним из ключевых процессов при атеросклерозе и приводит к усилению прокоагуляционных сдвигов в системе гемостаза и воспалению; а также снижать экспрессию, повышенного при диабете PAI-1, который замедляет процесс фибринолиза, что непосредственно ухудшает баланс в системе гемостаза [Спасов А.А., 2010; Сухарева О.Ю., 2012]. В исследованиях *in vivo* средства с инкретиновой активностью улучшали функциональное состояние эндотелия в условиях гипергликемии, при моделировании экспериментальной ишемии снижали размер некроза и возникающий неврологический дефицит [Аметов А.С., 2014а; Власов Т.Д., 2016], а в условиях клиники они снижали риск развития сосудистых осложнений СД 2 типа [Marso S.P., 2016; Ratner R., 2011]. При этом терапевтический потенциал средств с инкретиновой активностью при НМК в условиях сахарного диабета связывают с прямым протекторным действием на эндотелиальные клетки и нейроны, не исключая при этом гипогликемические свойства и способность снижать постпрандиальную гипергликемию.

Таким образом, на основании литературных данных и полученных результатов можно предположить, что церебропротекторное действие агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16 носит инкретинопосредованный характер и связано с нейропротекторными свойствами ГПП-1, снижением выраженности эндотелиальной дисфункции и прокоагулянтного потенциала крови.

## ГЛАВА 6. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сахарный диабет 2 типа существенно увеличивает риск развития инсульта. С учетом значительного роста числа пациентов с СД 2 типа, на фоне увеличения продолжительности жизни и старения населения, большой интерес представляют противодиабетические препараты, которые помимо гипогликемического действия способны снижать вероятность возникновения сердечно-сосудистых осложнений [Дедов И.И., 2015б; Мкртумян А.М., 2008б].

В основе формирования сосудистых осложнений лежит несколько патогенетических факторов СД: длительная гипергликемия, накопление конечных продуктов гликирования и активных форм кислорода в эндотелиоцитах, развитие эндотелиальной дисфункции, воспаление в сосудистой стенке и прокоагулянтное состояние системы свертывания крови [Тюренков И.Н., 2012б, 2013; Кособян Е.П., 2012; Стаценко М.Е., 2016; Ярек-мартынова И.Р., 2004]. Наличие СД 2 типа в анамнезе повышает риск развития инсульта в 3-7 раз, а риск смерти от инсульта 3-4 раза по сравнению с пациентами без диабета. Инсульт при СД отличается более тяжелым течением с быстрой трансформацией зоны пенумбры в некротизированную, даже если изначально очаги поражения были небольшими [Волчегорский И.А., 2016; Гудкова В.В., 2015; Стаховская Л.В., 2014].

Сахароснижающие средства с инкретиновой активностью (аналоги ГПП-1 и ингибиторы ДПП-4) – относительно молодая группа препаратов, которая сейчас успешно применяется для лечения СД 2 типа. По результатам клинических исследований, инкретиномиметики при СД 2 типа выражено уменьшают уровень гликозилированного гемоглобина, а также умеренно снижают артериальное давление, массу жировой ткани и улучшают липидный профиль пациентов [Аметов А.С., 2011; Мкртумян А.М., 2015; Сухарева О.Ю., 2012]. Аналоги ГПП-1 при добавлении их к стандартной гипогликемической терапии значимо снижают риск развития фатальных и нефатальных сердечно-сосудистых осложнений СД [Marso S.P., 2016; Ratner R., 2011]. Накопленные данные говорят о церебропротекторных свойствах инкретиномиметиков,

которые реализуются благодаря наличию рецептора к ГПП-1 на нейронах, клетках микроглии и эндотелиоцитах. Установлена его способность запускать важнейшие внутриклеточные сигнальные пути, поддерживающие функциональную активность клетки и ингибирующие процессы апоптоза в патологических условиях, обусловленных ишемией и нейродегенерацией [Zhu, H., 2016]. Показана способность инкретиномиметиков снижать активацию микроглии, выработку провоспалительных цитокинов, патологическую агрегацию белков и тормозить процессы апоптоза нейронов, а также улучшать функциональное состояние митохондрий, увеличивать экспрессию трофических факторов и стимулировать нейрогенез, что особенно важно в терапии нейродегенеративных заболеваний ГМ, в том числе, в условиях СД [Chen Y., 2015; Gumuslu E., 2016; Nassar N.N., 2015].

Широкое применение аналогов ГПП-1 для снижения риска сердечно-сосудистых осложнений при СД ограничено их неудобной лекарственной формой (подкожное введение, 2 или 1 раз в день) и высокой стоимостью. Ингибиторы ДПП-4 в ряде экспериментальных исследований показали наличие нейро- и эндотелиопротекторных свойств [Darsalia V., 2014б; Ma M., 2015; Yang D., 2013]. Терапевтический потенциал ингибиторов ДПП-4 при НМК остается изученным не до конца. Субстратами ДПП-4 являются ряд физиологически активных соединений: мозговой натрийуретический пептид (BNP), фактор, происходящий из стромальных клеток-1 $\beta$  (SDF-1 $\beta$ ), нейропептид Y (NPY), пептид YY (PYY) [Мкртумян А.М., 2015], повышение их концентрации может неоднозначно влиять на течение ишемии в острой фазе. Также, при СД происходит снижение секреции эндогенного ГПП-1 [Сухарева О.Ю., 2012], что может снизить гипогликемические и плейотропные эффекты ингибиторов ДПП-4. В постмаркетинговых исследованиях эффективности ингибиторов ДПП-4 и их побочных эффектов было установлено, что при длительном применении они могут вызывать боль в суставах и артрит [Mascolo A., 2016].

В настоящее время реализуется новый подход в коррекции сахарного диабета и его последствий путем воздействия на систему инкретинов, а именно путем увеличения их секреции [Ritter K., 2016]. Одними из соединений, которые увеличивают секрецию основных инкретинов являются агонисты рецептора GPR119 [Спасов А.А., 2015; Тюренков И.Н., 2015]. Этот рецептор был валидирован в качестве мишени для создания на его новых противодиабетических лекарственных средств.

Агонисты этого рецептора разрабатываются, как пероральные сахароснижающие средства с инкретиновой активностью для длительного применения при СД 2 типа [Lauffer L., 2008]. Они обладают двойным механизмом действия: стимулируют секрецию инкретинов, которая снижена при диабете, а при повышении уровня глюкозы, усиливают выработку инсулина. Стимуляция рецептора GPR119 с последующим повышением продукции ГПП-1 и ГИП – новая стратегия в создании средств с гипогликемической активностью [Тюренков И.Н., 2015; Спасов А.А., 2015]. Однако данные о нейропротекторном потенциале подобного подхода в настоящее время не многочисленны требуют проведения экспериментальных исследований.

В настоящей работе была произведена оценка церебропротекторной активности нового агониста рецептора GPR119– соединения ZB-16 ( $EC_{50}=7\text{нМ}$ ) (Рис. 3), синтезированного АО «ИИХР» (г. Химки, РФ), которое было отобрано из ряда агонистов рецептора GPR119 на основании его высокой активности в отношении данного рецептора.

На первом этапе исследования мы оценили церебропротекторное действие агониста рецептора GPR119 при моделировании НМК у интактных животных. При лечебно-профилактическом введении ZB-16 в дозе 1 мг/кг (по результатам предыдущих исследований, уже в дозе 1 мг/кг соединение оказывало максимальное гипогликемическое действие) мы отметили лишь тенденцию к снижению количества погибших животных и выраженности симптомов неврологического дефицита у выживших. Однако с увеличением

дозы исследуемого соединения (до 10 и 25 мг/кг) его церебропротекторное действие усиливалось: наблюдалось уменьшение гибели животных, а у выживших появлялась позитивная динамика, заключающаяся в снижении количества баллов неврологического дефицита по шкале McGraw и восстановлении нарушений координации в тесте «Ротарод». Спустя 72 часа после моделирования ишемии ГМ в группах животных, получавших ZB-16 соединения в дозах 10 и 25 мг/кг в тесте открытое поле показатель ориентировочно-исследовательской активности превышал более, чем в 2 раза таковой в группе без лечения. Траектория движений у животных в данных группах носила менее хаотичный характер, подавляющее большинство полностью обходило периметр «открытого поля», заглядывало в норки и делало стойки. В тесте УРПИ все животные не заходили в тёмный отсек установки, а в ТЭИ почти все (получавшие ZB-16) быстрее справлялись с задачей.

Опираясь на описанные в литературе нейропротекторные свойства ГПП-1, вырабатываемого L-клетками, мы ожидали, что вещество, стимулирующее секрецию ГПП-1 (агонист рецептора GPR119) может обладать нейропротекторным потенциалом. Описанное в главе 5.1.1. (стр.87), гипогликемическое действие агониста рецептора GPR119, соединения ZB-16 достигало максимального уровня в дозе 1 мг/кг. Дальнейшее повышение дозы не приводило к увеличению сахароснижающего действия. Можно было предположить, что соединение ZB-16 в дозе 1 мг/кг будет оказывать максимально выраженное церебропротекторное действие. Однако, как мы выяснили (описано в главе 5.1.2., стр.90), повышение секреции инсулина и развивающийся гипогликемический эффект зависит не только от концентрации ГПП-1 (в группах «СД+ZB-16» и «Интакт+ZB-16» после глюкозной нагрузки он был одинаково высокий: 68,0 и 78,9 пмоль/л), но и от функционального состояния инсулярного аппарата животного (уровень инсулина в группах «СД+ZB-16» и «Интакт+ZB-16» в тот момент отличался более, чем в 2 раза). Это дает основание предположить, что при повышении дозы ZB-16 с 1 до 10

мг/кг, секреция инкретинов продолжает повышаться с последующим ростом выраженности инкретин-опосредованных эффектов (не обязательно связанного с повышением гипогликемического действия).

Таким образом, соединение ZB-16 оказывает максимальное гипогликемическое действие в дозе 1 мг/кг, а церебропротекторное действие в дозе 10 мг/кг (и не увеличивается в дозе 25 мг/кг).

Препарат сравнения цитиколин в данном эксперименте вводился через 3 часа после моделирования НМК и далее каждые 24 часа. В группе, получавшей цитиколин наблюдалось значимое снижение количества погибших животных и наиболее выраженное снижение уровня неврологического дефицита. Данный результат также укладывается в рамки нашей гипотезы, поскольку цитиколин является хорошо изученным нейропротекторным препаратом, рекомендованным во всем мире к применению при ишемии ГМ, а наше соединение, позиционируется как гипогликемический препарат для длительного применения у больных СД 2 типа, обладающий церебропротекторным потенциалом.

На 2 этапе исследования, после моделирования стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД животные в течение 4-х недель получали гипогликемическую терапию (соединение ZB-16 (1 мг/кг), глосглиптин и метформин), далее перед и после моделирования внутрисосудистой окклюзии СМА доза ZB-16 увеличивалась до 10 мг/кг, глосглиптин и метформин продолжали вводиться в той же схеме.

Подобный дизайн, по нашему мнению, наиболее близко моделирует клиническую ситуацию, в которой у пациента с СД 2 типа на фоне корректного приема гипогликемического препарата (агониста рецептора GPR119, глосглиптина или метформина) возникает спонтанный инсульт, вследствие окклюзии мозговой артерии, что довольно часто происходит в клинике, вследствие отрыва тромба или других причин [Гудкова В.В., 2015]. Согласно клиническим рекомендациям, после восстановления кровотока по артерии (в нашем случае, извлечения окклюдера) в острейшем и остром периоде инсульта

гипогликемическая терапия сохраняется с недопущением гипер- и гипогликемии [Стаховская Л.В., 2014].

После моделирования ишемии контрольная группа животных, не получавших гипогликемическую терапию, была разделена на две части. Одна из них продолжала получать физ.р-р ("ОСМА+физ.р-р"), другая через 3 часа после ОСМА и далее каждые 24 часа (2-е суток) получала цитиколин ("ОСМА+Цитиколин"). Дополнительная группа была добавлена с целью оценить влияние нейропротекторной терапии на выраженность последствий НМК на фоне диабета без корректной гипогликемической терапии.

На этапе выбора длительности окклюзии СМА мы столкнулись с высокой чувствительностью животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД к ишемическому поражению и нами была выбрана 30-ти минутная длительность ОСМА, после которой у крыс без диабета, практически отсутствовали признаки ишемического поражения ГМ. Это согласуется с тем, что в клинике, инсульт на фоне СД отличается более тяжелым течением с высоким (в 3-4 раза) риском смерти по сравнению с пациентами без СД [Гудкова В.В., 2015]. Так, в нашем исследовании было отмечено, что животные в группах, не получавших гипогликемическую терапию ("ОСМА+физ.р-р" и "ОСМА+Цитиколин") были значительно более чувствительны к ишемическому поражению ГМ. В данных группах наблюдался наиболее выраженный психоневрологический дефицит, значительный размер зоны инфаркта и большее содержание ТБК-активных продуктов.

Введение цитиколина животным с фокальной ишемией без гипогликемической терапии не приводило к значительному снижению последствий НМК. Причиной тому, очевидно, является ряд нарушений (эндотелиальная дисфункция, нарушения в системе гемостаза, повышение образования продуктов ПОЛ и др.), которые формировались на фоне гипергликемии (4 нед.) и которые значительно снизили возможности нейропротекторной терапии у данных животных. В клинике примерно похожие ситуации возникают довольно часто, когда при НМК на фоне неадекватного

лечения или некомпенсированного СД 2 типа лечение пациента значительно затруднено. Множеством КИ (UKPDS, ACCORD, ADVANCE, VADT и др.) показана важность контроля гликемии для снижения риска развития микро- и макрососудистых осложнений СД. Снижение HbA<sub>1c</sub> на 1% уменьшает риск смерти от сердечно-сосудистых осложнений у диабетиков на 7,5% [Lorber D., 2013]. При этом гипогликемическая терапия должна подбираться с акцентом на снижение постпрандиального уровня глюкозы без риска развития гипогликемического состояния между приемами пищи.

Остальные 3 группы на протяжении всего эксперимента в качестве гипогликемической терапии получали ZB-16, глосглиптин и метформин. Выраженность последствий ишемического повреждения ГМ была ниже в группах, получавших соединения с инкретиновой активностью: глосглиптин и, особенно, агонист рецептора GPR119, соединение ZB-16. У животных данных групп отмечалось значимое снижение размера инфаркта, выраженности неврологического дефицита, нарушений координаций, а также повышение двигательной и ориентировочно-исследовательской активности. Также в данных группах значимо снижалось содержание ТБК-активных продуктов в плазме и увеличивалась продолжительность кислотного гемолиза эритроцитов.

Во множестве исследований было показано, что активация рецептора к ГПП-1 оказывает действие на разные патогенетические звенья СД, инфаркта миокарда, инсульта и нейродегенеративных заболеваний: снижение эндотелиальной дисфункции, воспаления сосудистой стенки и провоспалительной активации макрофагов (микроглии), ингибирование апоптоза кардиомиоцитов и нейронов при ишемическом поражении. В клинических и экспериментальных исследованиях это приводило к снижению риска развития сосудистых осложнений СД и уменьшению размера некроза при инсульте или инфаркте миокарда [Власов Т.Д., 2016; Симаненкова А.В., 2014; Green J.V., 2015; Marso S.P., 2016].

Гипогликемическая активность ZB-16 на всем протяжении эксперимента (описанного в главе глава 5.1.1., стр.87) незначительно превышала таковую у

госоглиптина, что возможно обусловлено двойным механизмом действия агонистов рецептора GPR119 (повышение уровня ГПП-1 и инсулина). Ингибиторы ДПП-4 замедляют разрушение эндогенных инкретинов, однако их секреция при сахарном диабете снижается. Можно предположить, что причиной, более выраженной церебропротекторной активности ZB-16 является не только лучший контроль уровня гликемии, но и больший уровень содержания инкретинов в плазме на протяжении всего периода эксперимента.

В группе, получавшей метформин наблюдалась видимая динамика к снижению размера инфаркта и выраженности неврологического дефицита по шкалам «Garcia» и «Combs и D'Alecy». Также через 48 часов после моделирования НМК в данной группе наблюдалось значимое повышение времени удержания на вращающемся стержне в тесте «Ротарод» за 3 попытки, повышение двигательной активности «Открытом поле» и увеличение времени захода в темный отсек в тесте УРПИ (т.е. лучшее сохранение памятного следа по сравнению с контрольной группой). При этом в группе, получавшей метформин значимо снижалась концентрация ТБК-активных продуктов в плазме и увеличивалась длительность кислотного гемолиза эритроцитов.

Метформин по результатам многих лет использования проявил не только выраженную гипогликемическую активность, но и показал снижение риска сосудистых осложнений СД 2 типа, что по мнению экспертов реализуется благодаря снижению периферической инсулинорезистентности, улучшению утилизации глюкозы и улучшению липидного профиля. Однако в литературе нет однозначных данных о его непосредственном влиянии на течение ОНМК [Jia J., 2015; Li J., 2010]. В нашем исследовании, наблюдаемая тенденция к уменьшению размера инфаркта, снижения некоторых показателей неврологического дефицита и интенсивности перекисного окисления может быть следствием эффективного контроля гликемии на всем протяжении эксперимента, что было показано в главе 5.1.1. (стр.87).

Оценка гипогликемической активности соединения ZB-16 была произведена с использованием животных со стрептозотоцин-никотинамид-

индуцированным СД. При курсовом (4 нед.) введении соединения ZB-16 у животных отмечалось снижение уровня гликемии, а также (начиная со 2-й недели) улучшалась утилизация глюкозы (уменьшалась толерантность к глюкозе и снижалась площадь под кривой «уровень гликемии-время» при проведении ПТТГ). При этом гипогликемическое действие исследуемого соединения проявлялось при его использовании в дозе 0,1 мг/кг (per os 1 раз в сутки), повышалось с увеличением до 1 мг/кг и оставалось неизменным при увеличении до 10 мг/кг.

Для многих агонистов рецептора GPR119 ранее отмечался низкий диапазон эффективных доз, так соединение BMS-903452 (компания Bristol-Myers Squibb, I стадия КИ) проявляло максимальную гипогликемическую активность на животных в дозах 0,3 и 1 мг/кг [Ritter K., 2016].

Гипогликемическое действие соединения ZB-16 усиливается при его курсовом (4 недели) применении у животных с экспериментальным диабетом и было сопоставимо с метформином и превышало таковое у госоглиптина. Известно, что гипогликемическое действие метформина обусловлено снижением периферической инсулинорезистентности, подавлением глюконеогенеза в печени и замедлением кишечной абсорбции глюкозы [Демидова И.Ю., 2009]. В нашем исследовании использовалась модель стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД, при которой этиологической причиной нарушения углеводного обмена является частичное поражение бета-клеточной массы [Спасов А.А., 2011; Masiello P., 1998], и которая может соответствовать одной из клинических форм СД 2 типа, вызванной в первую очередь нарушением секреции инсулина. Выраженное гипогликемическое действие метформина (препарата первой линии для лечения СД 2 типа) на всем протяжении эксперимента подтверждает корректность выбранной экспериментальной модели. Перспективность агонистов рецептора GPR119 обусловлена не только их гипогликемическим действием, но и возможным наличием у них инкретин-опосредованных плейотропных эффектов.

С начала использования ингибиторов ДПП-4 для лечения СД 2 типа прошло более 10 лет. За это время препараты данной группы получили широкое распространение в мире и зарекомендовали себя как умеренно эффективные гипогликемические препараты (снижение HbA1c на монотерапии: 0,5-1,0%) с низким риском развития гипогликемии, плеiotропными эффектами и возможностью создания рациональных комбинаций с сахароснижающими препаратами других групп (метформин, ингибиторы SGLT2, производные сульфонилмочевины и др.) [Анциферов М.Б., 2016; Дедов И.И., 2015a; Moses R.G., 2016].

Однако ряд исследователей отмечают, что при эффективном блокировании ДПП-4 (80-90%) накопление активного ГПП-1 не носит линейный характер (период полураспада ГПП-1 возрастает примерно от 1 до 5 минут с повышением концентрации в 2-3 раза (15-30 пмоль/л)), в то время как использование синтетических аналогов ГПП-1 эффективней, как минимум в 2 раза (плазменная концентрация устойчивых к деградации аналогов ГПП-1 достигает 50-60 пмоль/л) [Dai H., 2008; Singh A.K., 2014]. Мы предполагаем, что гипогликемический эффект исследуемого соединения, не будет значительно уступать таковому у синтетических аналогов ГПП-1, благодаря его способности оказывать влияние непосредственно на энтероэндокринные клетки кишечника и бета-клетки поджелудочной железы, с повышением секреции инкретинов и глюкозозависимой секреции инсулина.

Детальное исследование влияния агониста рецептора GPR119 на уровень ГПП-1, инсулина и глюкозы проводили на интактных (ZB-16 вводили однократно, за 1 час до глюкозной нагрузки) и животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД (получавших агонист рецептора GPR119 в течение 4-х недель).

Агонист рецептора GPR119, соединение ZB-16 после курсового введения животным со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД и при однократном введении интактным животным значительно (более чем в 2 раза) повышает тощаковый (базальный) уровень ГПП-1 (Рис. 27). Что совпадает с

литературными данными, по которым агонисты GPR119, взаимодействуя с данным рецептором на энтероэндокринных клетках, повышают секрецию ими инкретинов независимо от уровня гликемии [Lan H., 2012; Watterson K.R., 2014]. Через 15 минут после глюкозной нагрузки в этих группах наблюдался значительно больший подъем уровня ГПП-1, чем в тех, которые получали физ.р-р. У животных с сахарным диабетом (курсовое введение ZB-16), после введения глюкозы уровень ГПП-1 почти в 2 раза превысил таковой в контрольной, достигнув среднего значения  $68,0 \pm 10,6$  пмоль/л. У интактных животных (однократное введение ZB-16) после глюкозной нагрузки уровень ГПП-1 превысил таковой в контрольной группе на 38% ( $78,9 \pm 9,3$  пмоль/л) (Рис. 27).

Необходимо уточнить, что в норме уровень ГПП-1 через 15-20 минут после глюкозной нагрузки достигает пика, повышаясь в несколько раз, а через 30 минут возвращается к исходному уровню. При длительной гипергликемии базальная и стимулированная (пероральным введением глюкозы) секреция ГПП-1 снижается [Ohlsson L., 2013]. Агонисты рецептора GPR119 при поступлении глюкозы в кишечник аддитивно повышают секрецию инкретинов [Lan H., 2012; Watterson K.R., 2014].

В нашем эксперименте у контрольных животных с диабетом было отмечено снижение и базальной и стимулированной секреции ГПП-1 по сравнению с интактными. При этом агонист рецептора GPR119 у животных с диабетом почти в 2 раза повышал базальный и стимулированный уровень ГПП-1, а у животных без диабета, получавших ZB-16, при значительном подъеме базального уровня ГПП-1, стимулированная секреция ГПП-1 лишь на 38% превышала таковую у интактных животных. Это говорит о большей эффективности агониста GPR119 в условиях сахарного диабета, нежели чем в условиях интактного организма.

При анализе уровня инсулина перед глюкозной нагрузкой, было отмечено, что предварительное введение соединения ZB-16 приводило к повышению тощачового уровня инсулина у животных с СД на 11% и не

оказывало влияние на тощаковый уровень инсулина у интактных животных (Рис. 27). Это согласуется с литературными данными, согласно которым взаимодействие агонистов с рецептором GPR119, расположенным на бета-клетках приводит к повышению секреции инсулина только при росте уровня гликемии, а при введении агонистов интактным животным, уровень гликемии не опускается ниже 4,0 ммоль/л [Lan H., 2012; Watterson K.R., 2014].

Через 15 минут после пероральной глюкозной нагрузки в сериях интактных и животных с диабетом было отмечена совершенно различная степень влияния соединения ZB-16 на уровень инсулина. Если у животных с диабетом соединение ZB-16 при курсовом приеме повышало уровень инсулина на 38%, то у интактных на 78% (при однократном приеме). Иными словами, в нашем эксперименте по способности повышать секрецию инсулина при глюкозной нагрузке был в 2 раза эффективней у интактных животных, чем у крыс со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД. Очевидно наблюдаемый подъем уровня инсулина в группах (с и без диабета), получавших ZB-16 был ограничен функциональными возможностями бета клеточного (инсулярного) аппарата животных.

Повышение секреции инсулина является лишь одним из направлений действия средств с инкретиновой активностью. Активация рецептора к ГПП-1 вызывает ряд других, в совокупности не менее важных противодиабетических эффектов: снижение секреции глюкагона, скорости опустошения желудка и потребления пищи, а также стимуляция пролиферации бета-клеток и ряд плеiotропных эффектов, связанных со снижением риска развития сердечно-сосудистых осложнений СД [Аметов А.С., 2014а; Власов Т.Д., 2016; Сухарева О.Ю., 2012].

Дважды в нашей работе мы оценивали функциональное состояние эндотелия и показатели гемостаза у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД: после 4-х недельного введения исследуемого соединения и препаратов сравнения (глава 5.2., стр.94), а также спустя 2-е суток после моделирования НМК на фоне сахарного диабета (глава 5.3., стр.100).

Спустя 4 недели после моделирования диабета и курсового введения исследуемого соединения и препаратов сравнения у всех экспериментальных групп была произведена оценка эндотелийзависимой вазодилатации. Отмечено, что введение всех трех гипогликемических препаратов способствует улучшению функционального состояния эндотелия у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД по сравнению с группой без гипогликемической терапии. При этом эндотелийзависимая вазодилатация (степень сосудистого ответа на модификаторы синтеза NO) наблюдалась в группе, получавшей метформин. Также сопоставимо во всех группах отмечалась нормализация АЧТВ, ПВ, ТВ, уровня фибриногена в плазме, а также нормализация степени и скорости агрегации тромбоцитов по сравнению с контрольной группой.

Такое наблюдение говорит об улучшении функционального состояния эндотелия у животных с сахарным диабетом на фоне введения агониста рецептора GPR119, госоглиптина и метформина. Это может быть связано, как с их гипогликемической активностью, но также может являться следствием эндотелиопротекторного действия, описанного как для соединений с инкретиновой активностью, так и для метформина [Cameron-Vendrig A., 2016; Ghosh S., 2015; Wei R., 2016].

Однако при оценке состояния эндотелия у животных с НМК на фоне СД, значимые изменения мозгового кровотока при введении ацетилхолина и нитро-L-аргинина, по сравнению с таковыми в контрольной группе, наблюдались только в группах, получавших ZB-16 и госоглиптин. Также в этих группах наблюдалась нормализация параметров плазменного и тромбоцитарного гемостаза. В группе, получавшей метформин, наблюдаемая тенденция к нормализации эндотелийзависимой вазодилатации и параметров гемостаза не достигали уровня статистической значимости.

Полученные данные указывают на выраженное церебропротекторное действие агониста рецептора GPR119 при ишемии ГМ на фоне стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД. Мы можем отметить, что ингибитор ДПП-

4, глосглиптин также в данных условиях проявил выраженную церебропротекторную активность. При этом введение метформина экспериментальным животным с фокальной ишемией на фоне СД не привело к выраженному протекторному эффекту.

Метформин в настоящее время во всем мире является препаратом первой линии для лечения пациентов с СД 2 типа, у которых значительно повышен риск развития ишемии ГМ и нейродегенеративных заболеваний. Данный препарат снижает риск сосудистых осложнений диабета, но наличие прямого нейропротекторного действия при НМК остается спорным вопросом [Jia J., 2015; Li J., 2010].

### **Заключение**

Таким образом, в результате проведенного исследования мы показали, что агонист рецептора GPR119 – соединение ZB-16 оказывает церебропротекторное действие у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, что вероятно обусловлено не только его инкретинопосредованной гипогликемической активностью (контролем гликемии у данных животных), но и инкретинопосредованным нейро- и эндотелиотропным действием.

Проведенное исследование позволяет расширить представление о церебропротекторных свойствах и механизмах действия новой группы соединений с гипогликемической активностью в классе инкретиномиметиков – агонистов рецептора GPR119, которые, повышая выработку инкретинов, могут оказывать не только гипогликемическое действие, но и защищать нейроны и сосуды головного мозга в условиях ишемии.

## ВЫВОДЫ

1. Лечебно-профилактическое введение агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16 при перевязке общих сонных артерий интактным животным уменьшает их гибель на 30% в сравнении с животными контрольной группы, а у выживших снижает выраженность неврологического (в среднем на 35-40%) и когнитивного дефицита по сравнению с группой без лечения.

2. Соединение ZB-16 в дозе 10 мг/кг оказывает наиболее выраженное церебропротекторное действие в условиях ишемии головного мозга, вызванной перевязкой общих сонных артерий у интактных животных, сопоставимое с таковым у цитиколина.

3. Агонист рецептора GPR119 – ZB-16 при лечебно-профилактическом 4-х недельном введении животным со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным сахарным диабетом и последующим моделированием ишемии ГМ, оказывает выраженное церебропротекторное действие, по сравнению с группой без лечения снижая размер инфаркта (на 43%), степень отека мозга (на 47%), неврологический (по шкале «García» и «Combs и D'Alecy» в среднем на 74 и 61%) и когнитивный дефицит, содержание ТБК-активных продуктов в плазме (на 26%), а также улучшая вазодилатирующую и антитромботическую функцию эндотелия мозговых сосудов.

4. В условиях стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного сахарного диабета соединение ZB-16 оказывает выраженное гипогликемическое действие, при ПТТГ снижая площадь под кривой «уровень гликемии-время» (на 26%), повышая до и после глюкозной нагрузки секрецию ГПП-1 (на 121 и 90%) и инсулина (на 11 и 38%) по сравнению с контрольной группой без лечения.

5. Механизм церебропротекторного действия агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16 в условиях экспериментальной ишемии головного мозга на фоне сахарного диабета обусловлен инкретинопосредованным гипогликемическим, нейропротекторным и эндотелиотропным действием.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Выявленное церебропротекторное действие агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16 в условиях моделирования нарушений мозгового кровообращения при СД 2 свидетельствует о перспективности создания на его основе гипогликемического препарата для лечения больных с сахарным диабетом 2 типа и высоким риском ишемического поражения ГМ.

2. Целесообразно продолжить синтез и дальнейший поиск новых эффективных гипогликемических препаратов с церебропротекторным действием среди агонистов рецептора GPR119, стимулирующих секрецию инкретинов.

3. Включение в учебные пособия по фармакологии в разделы «средства терапии сахарного диабета 2 типа» результаты настоящей работы по экспериментальному изучению гипогликемической и церебропротекторной активности нового агониста рецептора GPR119 является целесообразным.

**ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АЦ – аденилатциклаза

АЧТВ – активированное частично тромбопластиновое время

ГИП – глюкозозависимый инсулиотропный полипептид

ГМ – головной мозг

ГМК – гладкомышечные клетки

ГПП-1 – глюкагоноподобный пептид 1

ГПП-1R – рецептор глюкагоноподобного пептида-1

ДПП-4 – дипептидил-пептидаза 4 типа

ИИ – ишемический инсульт

ИФА – иммуноферментный анализ

КИ – клинические исследования

КПГ – конечные продукты гликирования

ЛО – ложнооперированные животные

ЛП – латентный период

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

МК – мозговой кровоток

НМК – нарушение мозгового кровообращения

ОНМК – острые нарушения мозгового кровообращения

ООСА – окклюзия общих сонных артерий

ОП – Открытое поле

ОСА – общая сонная артерия

ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии

ПВ – протромбиновое время

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПТТГ – пероральный тест на толерантность к глюкозе

СД – сахарный диабет

СМА – средняя мозговая артерия

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ТБК-АП – ТБК-активные продукты

ТВ – тромбиновое время

ТЭИ – тест экстраполяционного избавления

УРПИИ – условный рефлекс пассивного избегания

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЧСС – частота сердечных сокращений

BDNF – нейротрофический фактор головного мозга

EC50 – полумаксимальная эффективная концентрация

eNOS – эндотелиальная NO-синтаза

ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии 1 типа

IDF – Международная диабетическая федерация

IFN- $\gamma$  – интерферон-  $\gamma$

IL-1 $\beta$ /4/6/10/23 – интерлейкин 1 $\beta$ /4/6/10/23

NO – оксид азота

PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа

PKA – протеинкиназа А

PKB – протеинкиназа В

TNF $\alpha$  – фактор некроза опухоли- $\alpha$

VCAM-1 – молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Аметов, А.С. (а) Кардиопротективные эффекты агонистов рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 / А.С. Аметов, Л.Л. Камынина, З.Г. Ахмедова // Кардиология. – Т.54, №7 – 2014. – С.92-96.
2. Аметов, А.С. (б) Сахарный диабет и сердечно-сосудистые заболевания / А.С.Аметов, И.О. Курочкин, А.А. Зубков // Русский медицинский журнал. – 2014. – Т.22, №13. – С.958-943.
3. Аметов, А.С. Клиническая эффективность фенофибрата в коррекции оксидативного стресса у пациентов с диабетическим нейропатией и сахарным диабетом типа 2 / А.С. Аметов, Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурнина, М.А. Прудникова // Эндокринология: новости, мнения, обучение. – 2016. – Т.14, №1. – С.65-72.
4. Аметов, А.С. Первый аналог человеческого глюкагоноподобного пептида-1: эффекты лираглутида по данным клинических исследований / А.С.Аметов, Л.Л. Камынина // Сахарный диабет. – 2011. – №4. – С.39–45.
5. Аметов, А.С. «Инкретины» в терапии больных сахарным диабетом 2 типа: фокус на сердечно-сосудистую безопасность / А.С. Аметов, Н.К. Кулиджанян // Эффективная фармакотерапия. – 2013. – №5. – С.26-31.
6. Анциферов, М.Б. Применение саксаглиптина и его комбинации с метформином в терапии сахарного диабета 2 типа у пожилых пациентов / М.Б. Анциферов // Фарматека. – 2016. – №5. – С.38-44.
7. Асташев, П.Е. Эндотелий – структурная основа системы кровообращения: история проблемы / Ю.Л. Шевченко, П.Е. Асташев, С.А. Матвеев, В.Г. Гудымович // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И.Пирогова. – 2011. – Т. 6, №2. – С.9-15.
8. Баркаган, З.С. Основы диагностики нарушений гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот. – М.: Ньюдиамед, 2001. – 285 с.
9. Булаева, Н.И. Эндотелиальная дисфункция и оксидативный стресс: роль в развитии кардиоваскулярной патологии / Н.И. Булаева, Е.З. Голухова // Креативная кардиология. – 2013. – №1. – С.14-22.

10. Власов, Т.Д. Механизмы нейропротективного действия инкретиномиметиков / Т.Д. Власов, А.В. Симаненкова, С.В. Дора, Е.В. Шляхто // Сахарный диабет. – 2016. – Т. 19, №1 – С. 16-23.
11. Волчегорский, И.А. Влияние реамберина и  $\alpha$ -липоевой кислоты на устойчивость к острой церебральной ишемии при экспериментальном сахарном диабете / И.А. Волчегорский, И.Ю. Мирошниченко, Л.М. Рассохина, Р.М. Файзуллин // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2016. – Т.116, №6. – С.53-59.
12. Воробьев, П.А. Оценка медицинской технологии применения лекарственных препаратов с ноотропным и психостимулирующим действием: кортексин, пирацетам, цитиколин, церебролизин / П.А. Воробьев, Л.Ю. Безмельница, Л.С. Краснова [и др.] // Клиническая геронтология. – 2013. – Т.19, №11-12. – С.14-25.
13. Воронина, Т.А. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия / Т.А. Воронина, Р.У. Островская, Т.Л. Гарибова // В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч.1. М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
14. Воронина, Т.А. Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ / Т.А. Воронина, Р.У. Островская // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: ИИА «Ремедиум», 2000. – С.153-161.
15. Воронков, А.В. Изучение " L-аргининового парадокса" для оценки эндотелиальной функции в норме и патологии / А.В. Воронков, А.И. Робертус, И.Н. Тюренков // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2008. – Т.7, №3. – С.54-57.
16. Габбасов, З.А. Новый методический подход к исследованию агрегации тромбоцитов *in vitro* / З.А. Габбасов, Е.Г. Попов, И.Ю. Гаврилов // Бюлл.экспер.биол.и мед. – 1989. – №10. – С.437-439.

17. Галстян, К.О. Первый отечественный ингибитор ДПП-4 гогоглиптин в сравнении с вилдаглиптином при лечении пациентов с сахарным диабетом 2 типа / К.О. Галстян, Л.В. Недосугова, Н.А. Петунина [и др.] // Сахарный диабет. – 2016. – Т. 19. – №1 – С. 89-96.
18. Ганнушкина, И.В Патофизиологические механизмы нарушений мозгового кровообращения и новые направления в их профилактике и лечении / И.В Ганнушкина // Журн. невропатол. и психиатр. – 1996. – Т.96, №1. – С.14.
19. Гланц, С. Медико-биологическая статистика: [пер. с англ.] / С. Гланц – М.: Практика. – 1999. – 459 С.
20. ГОСТ Р 51000.4-2011. Общие требования к аккредитации испытательных лабораторий. – Введ. 2013-01-01. – М.: Стандартиформ, 2013.
21. ГОСТ Р 51849-2001. Продукция комбикормовая. Информация для приобретателя. Общие требования (с Изменениями N 1, 2). – Введ. 2004-01-01. – М.: ИПК Издательство стандартов, 2002.
22. ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. – Введ. 2010-03-01. – М.: Стандартиформ, 2010.
23. Гудкова, В.В. Инсульт у больных сахарным диабетом как мультидисциплинарная проблема / В.В. Гудкова, Л.В. Стаховская, К.С. Мешкова, Т.В. Шанина // Consilium Medicum. – 2015. – Т.17, №9. – С.27-31.
24. Гусев, Е.И. Церебральный инсульт / Е.И. Гусев, М.Ю. Мартынов, П.Р. Камчатнов [и др.] // Consilium Medicum. – 2014. – №12. – С.13-17.
25. Дайнеко, А.С. Методы оценки неврологического дефицита у крыс после 30-минутной фокальной ишемии мозга на ранних и поздних сроках постишемического периода / А.С. Дайнеко, А.А. Шмонин, А.В. Шумеева // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2014. – Т.13, №1. – С.68-78.
26. Дедов, И.И. (а) Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Под редакцией И.И. Дедова, М.В. Шестаковой (7-й выпуск) / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, Г.Р. Галстян // Сахарный диабет. – 2015. – Т. 18, №1 (приложение 1). – С.1-112.

27. Дедов, И.И. (б) Инициация и интенсификация сахароснижающей терапии у больных сахарным диабетом 2 типа: обновление консенсуса совета экспертов российской ассоциации эндокринологов (2015 г.) / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, А.С. Аметов [и др.] // Сахарный диабет. – 2015. – Т.18, №1. – С.5-23.
28. Дедов, И.И. (в) Сосудистые поражения головного мозга при сахарном диабете: решенные и нерешенные вопросы / И.И. Дедов, М.В. Шестакова // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2015. – Т.115, №8. – С.79-82.
29. Дедов, И.И. Инновационные технологии в лечении и профилактике сахарного диабета и его осложнений / И.И. Дедов // Сахарный диабет. – 2013. – №3. – С.4-10.
30. Дедов, И.И. Распространенность сахарного диабета 2 типа у взрослого населения России (исследование NATION) / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, Г.Р. Галстян // Сахарный диабет. – 2016. – Т.19, №2. – С.104-112.
31. Демидова, И.Ю. Механизм действия и клиническое применение метформина (Сиофор®): обзор литературы / И.Ю. Демидова, Т.В. Горохова // Фарматека. – 2009. – №17. – С.10-15.
32. Ермолаева, А.И. Геморрагический инсульт при сахарном диабете типа 2 / А.И. Ермолаева // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – №1. – С.56-69.
33. Кайдашев, И.П. Физиологические и фармакологические эффекты глюкагоноподобного пептида-1 / И.П. Кайдашев // Международный эндокринологический журнал. – 2012. – Т. 47, №7. – 45-54.
34. Какорин, С.В. Контроль гликемии и сахароснижающая терапия у больных сахарным диабетом 2 типа с сердечно-сосудистыми заболеваниями (обзор многоцентровых рандомизированных клинических исследований) / С.В. Какорин, Р.А. Искандарян, А.М. Мкртумян // Сахарный диабет. – 2016. – Т.19, №3. – С.221-228.

35. Какорин, С.В. Острое нарушение мозгового кровообращения у больных сахарным диабетом 2 типа / С.В. Какорин, Э.В. Тулякова, К.В. Воронкова, А.М. Мкртумян // Сахарный диабет. – 2013. – №1(58). – С.63-70.
36. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С. Камышников. – 3 е изд. – М.: МЕДпресс информ, 2009. – 896 с.
37. Касаткина, С.Г. Значение дисфункции эндотелия у больных сахарным диабетом 2-го типа / Касаткина С.Г., Касаткин С.Н. // Фундаментальные исследования. – 2011. – №7. – С.248-252.
38. Колобродова, Н.А. Определение мутагенности нового вещества с антидиабетическим действием в микропланшетном варианте теста Эймса / Н.А. Колобродова, Г.Л. Снигур, Д.В. Куркин // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2015. – №2(46). – С.54-57.
39. Кособян, Е.П. Роль эндотелиальной дисфункции в развитии цереброваскулярного поражения у пациентов с сахарным диабетом / Е.П. Кособян, И.Р. Ярек-мартынова, М.Ю. Мартынов [и др.] // Сахарный диабет. – 2012. – №1. – С.42-48.
40. Ленская, К.В. Инновационные направления поиска лекарственных препаратов для лечения сахарного диабета типа 2 / К.В. Ленская, А.А. Спасов, Н.И. Чепляева // Вестник волгоградского государственного медицинского университета. – 2011. – №4. – С.10-18.
41. Мазо, В.К. Стрептозотоциновые модели сахарного диабета / В.К. Мазо, Ю.С. Сидорова, С.Н. Зорин, А.А. Кочеткова // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85, №4. – С.14-21.
42. Мельникова, Е.В. Патология гемостаза и системная воспалительная реакция у пациентов с ишемическим инсультом / Е.В. Мельникова, М.И. Кадинская, Д.В. Герасименко [и др.] // Врач. – 2011. – №14. – С.15-18.
43. Мирзоян, Р.С. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени / Р.С. Мирзоян, М.Б. Плотников, Т.С. Ганьшина //

Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч.1. – М.: Гриф и К, 2012. – С.478-485.

44. Мкртумян, А.М. (а) Патофизиологический подход в лечении сахарного диабета 2 типа / А.М. Мкртумян // Лечащий врач. – 2008. – №3. – С.92-95.

45. Мкртумян, А.М. (б) Постпрандиальный контроль гликемии – важнейшая задача современной диабетологии / А.М. Мкртумян, Е.В. Бирюкова, А.Л. Давыдов, Н.В. Маркина // Справочник поликлинического врача. – 2008. – №12. – С.54-58.

46. Мкртумян, А.М. Эффективность и безопасность ситаглиптина: доказательная база для клинического применения и перспективы / А.М. Мкртумян, Е.В. Бирюкова, И.А. Морозова // Поликлиника. – 2015. – №1-2. – С.63-70.

47. Недогода, С.В. Компенсация сахарного диабета и самоконтроль гликемии / С.В. Недогода, И.Н. Барыкина, А.С. Саласюк [и др.] // Consilium medicum. – 2015. – Т.17, №5. – С.68-72.

48. Недосугова, Л.В. Новый ингибитор ДПП-4 глосглиптин: первый опыт изучения эффективности и безопасности при сахарном диабете 2 типа в России / Л.В. Недосугова, Н.А. Петунина, К.О. Галстян // Сахарный диабет. – 2014. – №4. – С.81-86.

49. Оскола, Е.В. Ангиопротективные свойства сахароснижающих препаратов из группы ингибиторов дипептидилпептидазы-4 / Е.В. Оскола, А.Т. Шубина, Ю.А. Карпов // Терапевтический архив. – 2013. – Т.85, №9. – С.107-112.

50. Островская, Р.У. Методические рекомендации по изучению нейрорепродуктивной активности лекарственных средств / Р.У. Островская, К.С. Раевский, Т.А. Воронина [и др.] // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч.1. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 251-263.

51. Парфенов, В.А. Цитиколин в лечении инсульта и сосудистых когнитивных нарушений / В.А. Парфенов // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2009. – №3-4. – С.69-74.

52. Потемкин, В.В. Исследование некоторых параметров процесса перекисного окисления и активности каталазы при сахарном диабете 2 типа / В.В. Потемкин, Н.П. Микаелян, Е.Ю. Францева, Х.З. Нгуен // VII Всероссийский диабетологический конгресс «Сахарный диабет в XXI веке – время объединения усилий». Москва, 24-28 февраля 2015 г. С.62.
53. Рабаданова, А.И. Кислотная и осмотическая устойчивость эритроцитов периферической крови человека при действии стрессовых факторов различного генеза / А.И. Рабаданова, Д.М. Бамматмурзаева, Р.М. Гасасаева // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – №6. – С. 741.
54. Расулова, Х.А. Нарушение обмена оксида азота при ишемическом инсульте в зависимости от его патогенетических подтипов / Х.А. Расулова // Медицинский альманах. – 2013. – Т.25, №1. – С.111-114.
55. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О.Ю. Реброва. – М.: Медиасфера. – 2006. – 312 с.
56. Рязанцев, С.В. Проблемы старения населения России / С.В. Рязанцев, Н.П. Гусаков, Р.В. Маньшин // Научное обозрение. Серия 1. Экономика и право. – 2014. – №1. – С.83-87.
57. Саноцкий, И.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ. – М.: Медицина. – 1970. – 176 с.
58. Северина, А.С. Нарушение системы гемостаза у больных сахарным диабетом / А.С. Северина, М.В. Шестакова // Сахарный диабет. – 2004. – №1. – С.62-67.
59. Симаненкова, А.В. Нейропротективное действие агониста рецептора глюкогоноподобного пептида-1 / А.В. Симаненкова, А.А. Жигалова, А.Г. Шумеева [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2014. – №5. – С.156-159.
60. Смирнов, А.В. Патологическая анатомия цереброваскулярной болезни, стратегии стимуляции нейрогенеза / А.В. Смирнов, Н.В. Гоигорьева, Е.В. Горелик // Вестник ВолГМУ. – 2013. – Т.46, №2. – С.3-8.

61. Спасов, А.А. Методологический подход для изучения нейропротекторной активности в эксперименте / А.А. Спасов, В.Ю. Федорчук, Н.А. Гурова [и др.] // Ведомости НЦЭСМП. – 2014. – №4. – С.39-45.
62. Спасов, А.А. Влияние гипогликемических средств на гемостаз / А.А. Спасов, А.Ф. Кучерявенко, О.А. Салазникова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, №8. – С.26-28.
63. Спасов, А.А. Инкретины (физиология, патология, фармакология) / А.А. Спасов, М.П. Самохина, А.Е. Буланов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2009. – №4. – С.3-7.
64. Спасов, А.А. Потенциал фармакологической модуляции уровня и активности инкретинов при сахарном диабете типа 2 / А.А. Спасов, Н.И. Чепляева // Биомедицинская химия. – 2015. – Т.61, №4. – С.488-496.
65. Спасов, А.А. Фундаментальные основы поиска лекарственных средств для терапии сахарного диабета 2-го типа / А.А. Спасов, В.И. Петров, Н.И. Чепляева, К.В. Ленская // Вестник Российской Академии медицинских наук. – 2013. – №2. – С.43-49.
66. Спасов, А.А. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 / А.А. Спасов, М.П. Воронкова, Г.Л. Снигур [и др.] // Биомедицина. – 2011. – Т.1, №. 3. – С.12-19.
67. Спасов, А.А. Методические рекомендации по доклиническому изучению пероральных лекарственных средств для лечения сахарного диабета / А.А. Спасов, М.П. Воронкова, Г.Л. Снигур [и др.] // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч.1. – М.: Гриф и К, 2012. – С.670-684.
68. Стаховская, Л.В. Инсульт. Руководство для врачей. Под ред. Л.В. Стаховской, С.В. Котова. М.: Медицинское информационное агентство, 2014. – 400 с.
69. Стаценко, М.Е. Место р-FOX-ингибиторов свободных жирных кислот – в комбинированной терапии сердечно-сосудистых осложнений у больных

сахарным диабетом 2 типа / М.Е. Стаценко, С.В. Туркина, С.Н. Толстов // Российский кардиологический журнал. – 2011. – Т.88. – №2. – С.102-110.

70. Стаценко, М.Е. Значение нарушений углеводного и липидного обмена в развитии нарушений микроциркуляции у больных хронической сердечной недостаточностью и сахарным диабетом 2-го типа / М.Е. Стаценко, С.В. Туркина, Н.Н. Шилина, М.А. Косивцова // Клиническая медицина. – 2016. – Т.94, №6. – С.439-444.

71. Судаков, Н.П. Механизмы участия митохондрий в развитии патологических процессов, сопровождающихся ишемией и реперфузией / Н.П. Судаков, С.Б. Никифоров, Ю.М. Константинов [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – №5. – С.332-336.

72. Сунцов, Ю.И. Современные сахароснижающие препараты, используемые в России при лечении сахарного диабета 2 типа / Ю.И. Сунцов // Сахарный диабет. – 2012. – №1. – С.6-9.

73. Сухарева, О.Ю. Система инкретинов при сахарном диабете 2-го типа: сердечно-сосудистые эффекты / О.Ю. Сухарева, И.А. Шмушкович, Е.А. Шестакова, М.В. Шестакова // Проблемы эндокринологии. – 2012. – Т.58. – №6. – С.33-42.

74. Тюренков, И.Н. (а) Влияние различных композиций фенибута с органическими кислотами на неврологический, когнитивный и поведенческий дефицит у крыс при фокальной ишемии головного мозга / И.Н. Тюренков, Д.В. Куркин, Е.В. Волотова [и др.] // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – Т.115, №8. – С.061-063.

75. Тюренков, И.Н. (а) Роль эндотелиальной дисфункции в развитии сосудистых осложнений сахарного диабета / И.Н. Тюренков, А.В. Воронков, А.А. Слиецанс // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2013. – №2. – С.80-84.

76. Тюренков, И.Н. Десять новых мишеней для разработки лекарственных средств лечения СД 2 типа и метаболического синдрома/ И.Н. Тюренков, Д.В.

- Куркин, Е.В. Волотова [и др.] // Сахарный диабет. – 2015. – Т. 18, №. 1. – С.101-109.
77. Тюренков, И.Н. (б) Сравнительная церебропротекторная активность магния оксibuтирата, магния сульфата и кавинтона при их профилактическом введении на модели окклюзии общих сонных артерий у крыс / И.Н. Тюренков, А.А. Литвинов, Е.В. Волотова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т.79, №3. – С.3-8.
78. Тюренков, И.Н. (б) Эндотелиопротекторы – новый класс фармакологических препаратов / И.Н. Тюренков, А.В. Воронков, А.А. Слиецанс, Е.В. Волотова // Вестник российской академии медицинских наук. – 2012. – №7. – С. 50-57.
79. Тюренков, И.Н. Изучение нейропротекторного действия нового производного глутаминовой кислоты – нейроглутама при фокальной ишемии мозга у крыс / И.Н. Тюренков, Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин, Е.В. Волотова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77, №9. – С.8-12.
80. Тюренков, И.Н. Методический подход к оценке эндотелиальной дисфункции в эксперименте / И.Н. Тюренков, А.В. Воронков // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2008. – Т.71, №1. – С.49-51.
81. Хасанова, Ю.В. Патогенетические особенности системы гемостаза при сахарном диабете типа 2 / Ю.В. Хасанова, А.А. Нелаева, А.Е. Гамзина // Терапевт. – 2013. – №3. – С.42-47.
82. Чернецкий, Г.А. Способы определения резистентности эритроцитов / Г.А. Чернецкий. — Минск: Наука-Белорус, 2002. – 101 с.
83. Чернов, Ю.Н. Эндотелиальная дисфункция при сахарном диабете и возможные пути фармакологической коррекции / Ю.Н. Чернов, В.А. Красюкова, Г.А. Батищева, О.А. Мубаракшина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т.73, №2. – С.39-43.
84. Шамалов, Н.А. Реперфузионная терапия при ишемическом инсульте в Российской Федерации: проблемы и перспективы / Н.А. Шамалов // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2014. – №S2. – С.15-21.

85. Шестакова, М.В. Инкретины в лечении сахарного диабета 2 типа / М.В. Шестакова // Клиническая фармакология и терапия. – 2012. – Т.21, №2. – С.59-65.
86. Шестакова, М.В. Российское многоцентровое скрининговое исследование по выявлению недиагностированного сахарного диабета 2 типа у пациентов с сердечно-сосудистой патологией / М.В. Шестакова, И.Е. Чазова, Е.А. Шестакова // Сахарный диабет. – 2016. – Т.19, №1. – С.24-29.
87. Шмонин, А.А. Перевязка средней мозговой артерии крысы: сравнение модификаций моделей фокальной ишемии мозга у крысы / А.А. Шмонин // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2011. – Т.10, №3. – С.68-76.
88. Щепанкевич, Л.А. Клинические особенности ишемического инсульта, развившегося на фоне сахарного диабета 2 типа / Л.А. Щепанкевич, Е.В. Вострикова, П.И. Пилипенко [и др.] // Медицина и образование в Сибири. – 2012. – №3. – С.31.
89. Ярек-мартынова, И.Р. Сахарный диабет и эндотелиальная дисфункция / И.Р. Ярек-мартынова, М.В. Шестакова // Сахарный диабет. – 2004. – №2. – С.48-52.
90. Anagnostis, P. Glucagon-like peptide-1-based therapies and cardiovascular disease: looking beyond glycaemic control / P. Anagnostis, V.G. Athyros, F. Adamidou [et al.] // Diabetes Obes Metab. – 2011. – Vol.13, №4. – P.302-312.
91. Arakawa, M. Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4 / M. Arakawa, T. Mita, K. Azuma [et al.] // Diabetes. – 2010. – Vol.59, №4. – P.1030–1037.
92. Aronis, K.N. GLP-1 promotes angiogenesis in human endothelial cells in a dose-dependent manner, through the Akt, Src and PKC pathways / K.N. Aronis, J.P. Chamberland, C.S. Mantzoros // Metabolism. – 2013. – Vol.62, №9. – P.1279-1286.

93. Athauda, D. The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: mechanisms of action / D. Athauda, T. Foltynie // *Drug Discov Today*. – 2016. – Vol.21, №5. – P.802-818.
94. Bohlen, M. Calibration of rotational acceleration for the rotarod test of rodent motor coordination / M. Bohlen, A. Cameron, P. Metten et al // *J. Neurosci. Methods*. – 2009. – Vol. 178, № 1. – P. 10-14.
95. Born, G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal / G.V. Born // *Nature (Lond)*. – 1962. – Vol. 194. – P.927-929.
96. Brait, V.H. Mechanisms contributing to cerebral infarct size after stroke: gender, reperfusion, T lymphocytes, and Nox2-derived superoxide / V.H. Brait, K.A. Jackman, A.K. Walduck [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2010. – Vol.30, №7. – P.1306-1317.
97. Cabou, C. GLP-1, the gut-brain, and brain-periphery axes / C. Cabou, R. Burcelin // *Rev Diabet Stud*. – 2011. – Vol.8, №3. – P.418-431.
98. Cameron-Vendrig, A. Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Activation Attenuates Platelet Aggregation and Thrombosis / A. Cameron-Vendrig, A. Reheman, M.A. Siraj [et al.] // *Diabetes*. – 2016. – Vol.65, №6. – P.1714-1723.
99. Campbell, J.E. Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action / J.E. Campbell, D.J. Drucker // *Cell Metab*. – 2013. – Vol.17, №6. – P.819-837.
100. Candeias, E.M. Gut-brain connection: The neuroprotective effects of the anti-diabetic drug liraglutide / E.M. Candeias, I.C. Sebastião, S.M. Cardoso [et al.] // *World J Diabetes*. – 2015. – Vol.6, №6. – P.807-827.
101. Cao, L. A novel dual GLP-1 and GIP incretin receptor agonist is neuroprotective in a mouse model of Parkinson's disease by reducing chronic inflammation in the brain / L. Cao, D. Li, P. Feng [et al.] // *Neuroreport*. – 2016. – Vol.27, №6. – P.384-391.
102. Chafeev M.A. Discovery of ZB40-0016 – a Novel GPR119 Agonist for Type 2 Diabetes Treatment / M.A. Chafeev, R.N. Karapetian, I.N. Tyurenkov, E.V. Volotova

// 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry. Novosibirsk, Russia, July 5-10, 2015. – P.69.

103. Chen, Y. Neuroprotective effects of geniposide in the MPTP mouse model of Parkinson's disease / Y. Chen, Y. Zhang, L. Li, C. Hölscher // *Eur J Pharmacol.* – 2015. – Vol.768. – P.21-27.

104. Chu, Z.L. A role for b-cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucose-dependent insulin release / Z.L. Chu, R.M. Jones, H. He [et al.] // *Endocrinology.* – 2007. – Vol.148. – P.2601–2609.

105. Combs, D.J. Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1,3-butanediol / D.J. Combs, L.G. D'Alecy // *Stroke.* – 1987. – Vol.18, №2. – P.503-511.

106. Costanzi, S. Seven transmembrane-spanning receptors for free fatty acids as therapeutic targets for diabetes mellitus: pharmacological, phylogenetic, and drug discovery aspects / S. Costanzi, S. Neumann, M.C. Gershengorn // *J Biol Chem.* – 2008. – Vol.283, № 24. – P.16269-16273.

107. Dai, H. Non-linear increase in GLP-1 levels in response to DPP-IV inhibition in healthy adult subjects / H. Dai, S.M. Gustavson, G.M. Preston [et al.] // *Diabetes Obes Metab.* – 2008. – Vol.10, №6. – P.506-13.

108. Darsalia, V. Glucagon-like peptide-1 receptor activation reduces ischaemic brain damage following stroke in Type 2 diabetic rats / V. Darsalia, S. Mansouri, H. Ortsäter [et al.] // *Clin Sci (Lond).* – 2012. – Vol.122, №10. – P.473-83.

109. Darsalia, V. (a) Exendin-4 reduces ischemic brain injury in normal and aged type 2 diabetic mice and promotes microglial M2 polarization / V. Darsalia, S. Hua, M. Larsson [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol.9, №8. – P.e103114.

110. Darsalia, V. (b) Linagliptin enhances neural stem cell proliferation after stroke in type 2 diabetic mice / V. Darsalia, A. Olverling, M. Larsson [et al.] // *Regul Pept.* – 2014. – Vol.190-191. – P.25-31.

111. El-Sahar, A.E. Sitagliptin attenuates transient cerebral ischemia/reperfusion injury in diabetic rats: implication of the oxidative-inflammatory-apoptotic pathway /

A.E. El-Sahar, M.M. Safar, H.F. Zaki [et al.] // *Life Sci.* – 2015. – Vol.126. – P.81-86.

112. Eriksson, L. Antidiabetic agents and endothelial dysfunction – beyond glucose control / L. Eriksson, T. Nyström // *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* – 2015. – Vol.117, №1. – P.15-25.

113. Farkas, E. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases / E. Farkas, P.G. Luiten, F. Bari // *Brain Res Rev.* – 2007. – Vol.54, №1. – P.162-180.

114. Ferreira, S.T. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease / S.T. Ferreira, J.R. Clarke, T.R. Bomfim, F.G. De Felice // *Alzheimers Dement.* – 2014. – Vol.10, №1 Suppl. – P.S76-83.

115. Fisman, E.Z. Antidiabetic treatment with gliptins: focus on cardiovascular effects and outcomes / E.Z. Fisman, A. Tenenbaum // *Cardiovasc Diabetol.* – 2015. – Vol.14. – P.129.

116. Fredriksson, R. Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives / R. Fredriksson, P.J. Hoglund, D.E. Gloriam [et al.] // *FEBS Lett.* – 2003. – Vol.554. – P.381–388.

117. Gao, J. Stimulating b-cell replication and improving islet graft function by AR231453, a GPR119 agonist / J. Gao, L. Tian, G. Weng [et al.] // *Transplant Proc.* – 2011. – Vol.43. – P.3217–3220.

118. Garcia, G.H. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats: statistical validation / G.H. Garcia, S. Wagner, K.F. Liu [et al.] // *Stroke.* – 1995. – Vol.26, №4. – P.627-634.

119. Ge, H. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids / H. Ge, X. Li, J. Weiszmann [et al.] // *Endocrinology.* – 2008. – Vol.149, №9. – P.4519-4526.

120. Ghosh, S. Metformin improves endothelial function in aortic tissue and microvascular endothelial cells subjected to diabetic hyperglycaemic conditions / S. Ghosh, A.P. Lakshmanan, M.J. Hwang [et al.] // *Biochem Pharmacol.* – 2015. – Vol.98, №3. – P.412-421.

121. Gonçalves, A. Protective Effect of a GLP-1 Analog on Ischemia-Reperfusion Induced Blood-Retinal Barrier Breakdown and Inflammation / A. Gonçalves, C.M. Lin, A. Muthusamy et al // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2016. – Vol.57, №6. – P.2584-2592.
122. Goto, H. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, reduces intimal thickening after vascular injury / H. Goto, T. Nomiya, T. Mita [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2011. – Vol.405, №1. – P.79-84.
123. Green, J.B. Effect of Sitagliptin on Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes / J.B. Green, M.A. Bethel, P.W. Armstrong [et al.] // *N Engl J Med.* – 2015. – Vol.373, №3. – P.232-242.
124. Gumuslu, E. Exenatide enhances cognitive performance and upregulates neurotrophic factor gene expression levels in diabetic mice / E. Gumuslu, O. Mutlu, I.K. Celikyurt [et al.] // *Fundam Clin Pharmacol.* – 2016. – Vol.30, №4. – P.376-384.
125. Heppner, K.M. Expression and distribution of glucagon-like peptide-1 receptor mRNA, protein and binding in the male nonhuman primate (*Macaca mulatta*) brain / K.M. Heppner, M. Kirigiti, A. Secher [et al.] // *Endocrinology.* – 2015. – Vol.156, №1. – P.255-267.
126. Hladovec, J. Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions / J. Hladovec // *Physiologia bohemoslovaca.* – 1977. – Vol. 27, № 2. – P.140-144.
127. International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. 7th edn. 2015. Brussels: IDF, P. 144. [www.idf.org/diabetesatlas](http://www.idf.org/diabetesatlas). (дата обращения 19.10.2016).
128. Ismail, T.A. Molecular and immunohistochemical effects of metformin in a rat model of type 2 diabetes mellitus / T.A. Ismail, M.M. Soliman, M.A. Nassan // *Exp Ther Med.* – 2015. – Vol.9, №5. – P.1921-1930.
129. Jia, J. Neuropharmacological Actions of Metformin in Stroke / J. Jia, J. Cheng, J. Ni, X. Zhen // *Curr Neuropharmacol.* – 2015. – Vol.13, №3. – P.389-394.
130. Jia, Q. Diabetes and poor outcomes within 6 months after acute ischemic stroke: the China National Stroke Registry / Q. Jia, X. Zhao, C. Wang [et al.] // *Stroke.* – 2011. – Vol.42, №10. – P.2758-2762.

131. Kang, S.U. GPR119 agonists: a promising approach for T2DM treatment? A SWOT analysis of GPR119 / S.U. Kang // *Drug Discov Today*. – 2013. – Vol.18, № 23-24. – P.1309-1315.
132. Kishore, P. Glycemic control and cardiovascular disease: what's a doctor to do? / P. Kishore, S.H. Kim, J.P. Crandall // *Curr Diab Rep*. – 2012. – Vol.12, №3. – P.255-64.
133. Kitasato, L. Postprandial hyperglycemia and endothelial function in type 2 diabetes: focus on mitiglinide / L. Kitasato, T. Tojo, Y. Hatakeyama [et al.] // *Cardiovasc Diabetol*. – 2012. – Vol.11. – P.79.
134. Koizumi, J.Y.Y. Experimental studies of ischemic brain edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area / J.Y.Y. Koizumi, T. Nakazawa, G. Ooneda // *Jpn J Stroke*. – 1986. – Vol.8. – P.1–8.
135. Körner, M. GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues: potential for in vivo targeting / M. Körner, M. Stöckli, B. Waser, J.C. Reubi // *J Nucl Med*. – 2007. – Vol.48, №5. – P.736-743.
136. Krasner, N.M. Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Analog Liraglutide Inhibits Endothelial Cell Inflammation through a Calcium and AMPK Dependent Mechanism / N.M. Krasner, Y. Ido, N.B. Ruderman, J.M. Cacicedo // *PLoS One*. – 2014. – Vol.9, №5. – P.e97554.
137. Kuge, Y. Nylon monofilament for intraluminal middle cerebral artery occlusion in rats / Y. Kuge, K. Minematsu, T. Yamaguchi, Y. Miyake // *Stroke*. – 1995. – Vol.26, №9. – P.1655-1657.
138. Lan, H. Agonists at GPR119 mediate secretion of GLP-1 from mouse enteroendocrine cells through glucose-independent pathways / H. Lan, H.V. Lin, C.F. Wang [et al.] // *Br J Pharmacol*. – 2012. – Vol.165. – P.2799–2807.
139. Lauffer L. GPR119: "double-dipping" for better glycemic control / L. Lauffer, R. Iakoubov, P.L. Brubaker // *Endocrinology*. – 2008. – Vol.149, №5. – P.2035-2037.

140. Li, J. Effects of metformin in experimental stroke / J. Li, S.E. Benashski, V.R. Venna, L.D. McCullough // *Stroke*. – 2010. – Vol.41, №11. – P.2645-52.
141. Longa, E.Z. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats / E.Z. Longa, P.R. Weinstein, S. Carlson, R. Cummins // *Stroke*. – 1989. – Vol.20. – P.84-91.
142. Lorber, D. GLP-1 Receptor Agonists: Effects on Cardiovascular Risk Reduction / D. Lorber // *Cardiovasc Ther*. – 2013. – Vol.31, №4. – P.238-249.
143. Luciani, P. Differentiating effects of the glucagon-like peptide-1 analogue exendin-4 in a human neuronal cell model / P. Luciani, C. Deledda, S. Benvenuti [et al.] // *Cell Mol Life Sci*. – 2010. – Vol.67, №21. – P.3711-3723.
144. Ma, M. DPP-4 inhibition with linagliptin ameliorates cognitive impairment and brain atrophy induced by transient cerebral ischemia in type 2 diabetic mice / M. Ma, Y. Hasegawa, N. Koibuchi [et al.] // *Cardiovasc Diabetol*. – 2015. – Vol.14. – P.54.
145. Marso, S.P. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes / S.P. Marso, G.H. Daniels, K. Brown-Frandsen [et al.] // *N Engl J Med*. – 2016. – Vol.375, №4. – P.311-322.
146. Mascolo, A. Dipeptidyl Peptidase (DPP)-4 Inhibitor-Induced Arthritis/Arthralgia: A Review of Clinical Cases / A. Mascolo, C. Rafaniello, L. Sportiello [et al.] // *Drug Saf*. – 2016. – Vol.39, №5. – P.401-407.
147. Masiello, P. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide / P. Masiello, C. Broca, R. Gross [et al.] // *Diabetes*. – 1998. – Vol.47. – P.224-229.
148. McClean, P.L. Prophylactic liraglutide treatment prevents amyloid plaque deposition, chronic inflammation and memory impairment in APP/PS1 mice / P.L. McClean, J. Jalewa, C. Hölscher // *Behav Brain Res*. – 2015. – Vol.293. – P.96-106.
149. Messenger, B. Glucose-dependent insulintropic polypeptide and insulin-like immunoreactivity in saliva following sham-fed and swallowed meals / B. Messenger, M.N. Clifford, L.M. Morgan // *J Endocrinol*. – 2003. – Vol.177, №3. – P.407-412.

150. Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Mihara, M. Uchiyama // *Anal Biochem.* – 1978. – Vol.86, №1. – P.271-278.
151. Morris, G.P. A comparative study of variables influencing ischemic injury in the longa and koizumi methods of intraluminal filament middle cerebral artery occlusion in mice / G.P. Morris, A.L. Wright, R.P. Tan [et al.] // *PLoS One.* – 2016. – Vol.11, №2. – P.e0148503.
152. Moses, R.G. A randomized clinical trial evaluating the safety and efficacy of sitagliptin added to the combination of sulfonylurea and metformin in patients with type 2 diabetes mellitus and inadequate glycemic control / R.G. Moses, E. Round, Y. Shentu [et al.] // *J Diabetes.* – 2016. – Vol.8, №5. – P.701-711.
153. Muto, C. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of PF-00734200, a DPP-IV inhibitor, in healthy Japanese subjects./ C. Muto, H. Dai, J.G. Teeter [et al.] // *Int J Clin Pharmacol Ther.* – 2012. – Vol.50, №7. – P.505-509.
154. Nagayama, K. Exendin-4 Prevents Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration by Angiotensin II via the Inhibition of ERK1/2 and JNK Signaling Pathways / K. Nagayama, Y. Kyotani, J. Zhao [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol.10, №9. – P.e0137960.
155. Nassar, N.N. Saxagliptin: a novel antiparkinsonian approach / N.N. Nassar, M.Y. Al-Shorbagy, H.H. Arab, D.M. Abdallah // *Neuropharmacology.* – 2015. – Vol.89. – P.308-317.
156. Ohlsson, L. Glucose-lowering effect of the DPP-4 inhibitor sitagliptin after glucose and non-glucose macronutrient ingestion in non-diabetic subjects / L. Ohlsson, W. Alsalim, R.D. Carr [et al.] // *Diabetes Obes Metab.* – 2013. – Vol.15, №6. – P.531-537.
157. Overton, H.A. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents / H.A. Overton, A.J. Babbs, S.M. Doel [et al.] // *Cell Metab.* – 2006. – Vol.3, №3. – P.167-175.

158. Overton, H.A. GPR119, a novel G protein-coupled receptor target for the treatment of type 2 diabetes and obesity / H.A. Overton, M.C. Fyfe, C. Reynet // *Br J Pharmacol.* – 2008. – Vol.153. – P.76–81.
159. Oyama, J. Do incretins improve endothelial function? / J. Oyama, Y. Higashi, K. Node // *Cardiovasc Diabetol.* – 2014. – Vol.13. – P.21.
160. Ratner, R. Cardiovascular safety of exenatide BID: an integrated analysis from controlled clinical trials in participants with type 2 diabetes / R. Ratner, J. Han, D. Nicewarner et al. // *Cardiovasc Diabetol.* – 2011. – Vol.10. – P.22.
161. Ravassa, S. GLP-1 and cardioprotection: from bench to bedside / S Ravassa, A Zudaire, J. Díez // *Cardiovasc Res.* – 2012. – Vol.94, №2. – P.316-323.
162. Ritter, K. G protein-coupled receptor 119 (GPR119) agonists for the treatment of diabetes: recent progress and prevailing challenges / K. Ritter, C. Buning, N. Halland [et al.] // *J Med Chem.* – 2016. – Vol.59, №8. – P.3579-92.
163. Saraiva, F. Cardiovascular effects of Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) receptor agonists / F. Saraiva, A.C. Sposito // *Cardiovasc Diabetol.* – 2014. – Vol. 13, № 1. – P.142.
164. Sharma, M.K. Neuroprotective and anti-apoptotic effects of liraglutide on SH-SY5Y cells exposed to methylglyoxal stress / M.K. Sharma, J. Jalewa, C. Hölscher // *J Neurochem.* – 2014. – Vol.128, №3. – P.459-471.
165. Sharma, R. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of ((3,3-difluoropyrrolidin-1-yl)((2S,4S)-4-(4-(pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl)pyrrolidin-2-yl)methanone, a dipeptidyl peptidase inhibitor, in rat, dog and human./ R. Sharma, H. Sun, D.W. Piotrowski [et al.] // *Drug Metab Dispos.* – 2012. – Vol.40, №11. – P.2143-2161.
166. Shiraishi, D. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) induces M2 polarization of human macrophages via STAT3 activation / D. Shiraishi, Y. Fujiwara, Y. Komohara [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2012. – Vol.425, №2. – P.304-308.
167. Singh, A.K. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: Novel mechanism of actions / A.K. Singh // *Indian J Endocrinol Metab.* – 2014. – Vol.18, №6. – P.753-759.

168. Soga, T. Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor / T. Soga, T. Ohishi, T. Matsui [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2005. – Vol.326, №4. – P. 744-751.
169. Takeda, S. Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence / S. Takeda, S. Kadowaki, T. Haga et al, // *FEBS Lett.* – 2002. – Vol.520, №1-3. – P.97-101.
170. Tate, M. Selective targeting of glucagon-like peptide-1 signalling as a novel therapeutic approach for cardiovascular disease in diabetes / M. Tate, A. Chong, E. Robinson [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2015. – Vol.172, №3. – P.721-736.
171. Thomas, L. (R)-8-(3-amino-piperidin-1-yl)-7-but-2-ynyl-3-methyl-1-(4-methyl-quinazolin-2-ylmethyl)-3,7-dihydro-purine-2,6-dione (BI 1356), a novel xanthine-based dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, has a superior potency and longer duration of action compared with other dipeptidyl peptidase-4 inhibitors / L. Thomas, M. Eckhardt, E. Langkopf [et al.] // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2008. – Vol.325, №1. – P.175-82.
172. Tomlinson, B. An overview of new GLP-1 receptor agonists for type 2 diabetes / B. Tomlinson, M. Hu, Y. Zhang [et al.] // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2016. – Vol.25, №2. – P.145-58.
173. Wang, W.Y. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease / W.Y. Wang, M.S. Tan, J.T. Yu, L. Tan // *Ann Transl Med.* – 2015. – Vol.3, №10. – P.136.
174. Watterson, K.R. Treatment of type 2 diabetes by free Fatty Acid receptor agonists / K.R. Watterson, B.D. Hudson, T. Ulven, G. Milligan // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2014. – Vol.5. – P.137.
175. Wei, R. Exenatide exerts direct protective effects on endothelial cells through the AMPK/Akt/eNOS pathway in a GLP-1 receptor-dependent manner / R. Wei, S. Ma, C. Wang [et al.] // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2016. – Vol.310, №11. – P.E947-57.

176. Xu, J. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction / J. Xu, M.H. Zou // *Circulation*. – 2009. – Vol.120, №13. – P.1266-1286.
177. Yang, D. Alogliptin, a dipeptidylpeptidase-4 inhibitor, for patients with diabetes mellitus type 2, induces tolerance to focal cerebral ischemia in non-diabetic, normal mice / D. Yang, Y. Nakajo, K. Iihara [et al.] // *Brain Res*. – 2013. – Vol.1517. – P.104-113.
178. Yoshida, S. The role of small molecule GPR119 agonist, AS1535907, in glucose-stimulated insulin secretion and pancreatic  $\beta$ -cell function / S. Yoshida, T. Ohishi, T. Matsui [et al.] // *Diabetes Obes Metab*. – 2011. – Vol.13, №1. – P.34-41.
179. Zhan, Y. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) protects vascular endothelial cells against advanced glycation end products (AGEs) – induced apoptosis / Y. Zhan, H.L. Sun, H. Chen [et al.] // *Med Sci Monit*. – 2012. – Vol.18, №7. – P.286-291.
180. Zhang, D. Potential roles of GPR120 and its agonists in the management of diabetes / D. Zhang, P.S. Leung // *Drug Des Devel Ther*. – 2014. – Vol.8. – P.1013-1027.
181. Zhu, H. The Neuroprotection of Liraglutide Against Ischaemia-induced Apoptosis through the Activation of the PI3K/AKT and MAPK Pathways / H. Zhu, Y. Zhang, Z. Shi [et al.] // *Sci Rep*. – 2016. – Vol.6. – P.26859.