

ФГБОУ ВО ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ МИНЗДРАВА РОССИИ

На правах рукописи

Куркин Денис Владимирович

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

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени доктора фармацевтических наук

Научный консультант:

член-корр. РАН, ЗРВИ РФ,

профессор, доктор медицинских наук

Иван Николаевич Тюренков

Волгоград, 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	9
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	20
1.1. Актуальность поиска новых гипогликемических лекарственных средств	20
1.2. Классификация сахарного диабета	25
1.3. Патогенетические аспекты гипергликемии.....	27
1.4. Современная фармакотерапия СД2.....	30
1.5. Обзор рынка гипогликемических лекарственных средств.....	36
1.6. Новые направления в разработке гипогликемических препаратов	44
1.7. Новые направления в разработке гипогликемических препаратов, влияющих на систему инкретинов	53
1.8. Плейотропные эффекты инкретиномиметиков	57
1.9. GPR119 как перспективная мишень для создания новых гипогликемических лекарственных средств	69
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	72
2.1 Экспериментальные животные	72
2.2 Исследования <i>in vitro</i>	73
2.3 Исследуемые соединения и препараты сравнения	75
2.4 Дизайн исследования	76
2.5 Методы экспериментального моделирования СД	78
2.6 Метод моделирования ожирения.....	80
2.7 Модель острого нарушения мозгового кровообращения	81
2.8 Метод моделирования хронического нарушения мозгового кровообращения	83
2.9 Методы определения концентрации глюкозы в крови и проведения ПТТГ	84
2.10 Метод оценки неврологического дефицита у животных	85
2.11 Методы оценки поведения, мнестической и когнитивных функций у животных	86
2.12 Метод регистрации уровня локального мозгового кровотока и определения выраженности эндотелиальной дисфункции.....	86

2.13	Методы изучения биохимических показателей.....	88
2.14	Методы изучения основных параметров гемостаза крови	89
2.15	Иммуноферментный анализ.....	90
2.16	Определение зоны инфаркта мозговой ткани при ОСМА.....	90
2.17	Морфологические методы исследования.....	91
2.18	Острая токсичность	92
2.19	Статистическая обработка результатов исследования.....	92
ГЛАВА 3. СКРИНИНГ СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ АГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ GPR119.....		
94		
3.1	Поиск агонистов GPR119, отбор соединений по результатам исследований in vitro.....	94
3.2	Изучение гипогликемического действия соединений-лидеров	107
3.3	Изучение острой токсичности агониста GRP-119 рецептора на мышах	116
3.4	Изучение острой токсичности агониста GRP-119 рецептора на крысах..	118
3.5	Заключение	120
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АГОНИСТА GPR119 НА ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ СД		
123		
4.1	Гипогликемическое действие агониста GPR119 на модели никотинамид-стрептозотоцин-индуцированного СД.....	124
4.2	Гипогликемическое действие агониста GPR119 и его комбинаций с ситаглиптином или метформином на модели экспериментального СД.....	127
4.3	Гипогликемическое действие различных доз агониста GPR119 в комбинации с метформином на модели экспериментального СД.....	134
4.4	Заключение	136
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ АГОНИСТА GPR119 НА ЖИВОТНЫХ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОЖИРОВОЙ И КАЛОРИЙНОЙ ДИЕТЫ.....		
137		
5.1	Влияние перорального введения агониста GPR119 на массу тела, потребление воды и пищи животными с ожирением, индуцированным их содержанием в условиях высокожировой и калорийной диеты.....	138
5.2	Влияние перорального введения агониста GPR119 и его комбинации с метформином и ситаглиптином на показатели углеводного и липидного обменов, а	

также эндотелиальную функцию у животных, содержащихся в условиях высокожировой и калорийной диеты	145
5.3 Заключение	156
ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АГОНИСТА GPR119...	159
6.1 Оценка влияния перорального введения соединения ZB-16 на секрецию ГПП-1, глюкагона и инсулина	160
6.2 Оценка влияния перорального введения соединения ZB-16 на длительность действия экзогенного инсулина	165
6.3 Оценка влияния перорального введения соединения ZB-16 на морфологические изменения в ткани поджелудочной железы крыс с ЭСД	167
6.4 Заключение	180
ГЛАВА 7. ИЗУЧЕНИЕ ПЛЕЙОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ АГОНИСТА GPR119.....	182
7.1. Изучение плеiotропных эффектов соединения ZB-16 и его комбинации с метформином на модели острого нарушения мозгового кровообращения, воспроизведенной на фоне экспериментального СД.....	184
7.2. Изучение плеiotропных эффектов соединения ZB-16 и его комбинации с метформином на модели хронического нарушения мозгового кровообращения, воспроизведенной на фоне экспериментального СД.....	202
7.3. Морфологическое исследование ткани головного мозга животных с экспериментальным СД и ХНМК, которым курсом перорально вводили соединение ZB-16, метформин, ситаглиптин и их комбинации	213
ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ	233
ВЫВОДЫ.....	254
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	257
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	258
Приложение 1	288
Приложение 2	295
Приложение 3	311
Приложение 4	318
Приложение 5	326
Приложение 6	327
Приложение 7	328
Приложение 8	329
Приложение 9	330

Приложение 10	331
Приложение 11	332
Приложение 12	333
Приложение 13	334
Приложение 14	335
Приложение 15	336
Приложение 16	337
Приложение 17	338
Приложение 18	339
Приложение 19	340
Приложение 20	341
Приложение 21	342
Приложение 22	343
Приложение 23	344
Приложение 24	345
Приложение 25	346
Приложение 26	347
Приложение 27	348
Приложение 28	349
Приложение 29	350
Приложение 30	351
Приложение 31	352

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

11b-HSD1 – 11 β -гидроксистероиддегидрогеназа 1-го типа, также кортизонредуктаза

ADMA – asymmetric dimethylarginine

BNP – натрийдиуретический пептид

CREB – cAMP response element-binding protein

DGAT-1 – diacylglycerol o-acyltransferase 1

DGAT-2 – diacylglycerol o-acyltransferase 2

EMA – european Medicines Agency – Европейское Агентство по оценке лекарственных препаратов

EPCs – endothelial progenitor cells эндотелиальные клетки-предшественники

ERK1/2 – extracellular signal-regulated kinase

FDA – food and drug administration – агентство Министерства здравоохранения и социальных служб США

FoxO1 – forkhead box protein O1

GPCR – англ. G-protein-coupled receptors, GPCRs, рецепторы, сопряженные с G-белком

HbA1c – гликированный гемоглобин, или гликогемоглобин

HMGB1 – англ. high-mobility group protein B1, или амфотерин

HO-1 – гемоксигеназа-1 (белок HO1)

HOMA-IR – homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance, Индекс инсулинорезистентности

ICAM-1 – inter-Cellular Adhesion Molecule 1

iNOS – индуцируемая NO-синтаза

JAK2 – янус киназа 2

NF- κ B – nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, ядерный фактор «каппа-би»

NOS – нитроксидсинтаза

NPY – neuropeptide Y

PDGF – platelet-derived growth factor, фактор роста тромбоцитов

PGC-1 α – peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α

PI3K – фосфоинозитид-3-киназа

PKA – protein kinase A, протеинкиназа A

PKB – protein kinase B, протеинкиназа B

PPAR γ – peroxisome proliferator-activated receptors, рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами

pRb – retinoblastoma protein, белок ретинобластомы

PTP1B – protein-tyrosine phosphatase 1B; протеин-тирозин фосфатаза 1B

PYY – пептид тирозин-тирозин

Rac1 – ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

ROS – активные формы кислорода

SCD1 –

SDF-1 – stromal cell-derived factor-1

SDF-1 β – stromal cell-derived factor-1

SGLT2 – sodium/glucose cotransporter 2; натрий-глюкозный-котранспортер-2

SIRT1 – англ. sirtuins или Silent Information Regulator 2 proteins - Сиртуин

STAT3 – signal transducer and activator of transcription 3; сигнальный белок и активатор транскрипции из семейства белков STAT

toll-like рецептор-2 – толл-подобные рецептор 2

toll-like рецептор-4 – толл-подобные рецептор 4

UCP2 – mitochondrial uncoupling protein-2; митохондриальный разобщающий белок-2

VCAM-1 – vascular cell adhesion molecule 1

VEGF – vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов ЦОГ –

аГПП-1 – агонист рецептора к глюкагонподобному пептиду

АД – артериальное давление

АКТГ – адренокортикотропный гормон

АМФК – AMP activated protein kinase; 5'АМФ-активируемая протеинкиназа

БА – болезнь Альцгеймера

ГИП – глюкозозависимый инсулиотропный полипептид

ГМК – гладкомышечные клетки

ГПП-1 – глюкагоноподобный пептид

ДПП-4 – дипептидилпептидаза 4-го типа

иДПП-4 – ингибиторы дипептидилпептидазы 4-го типа

КПГ – конечные продукты гликирования

ЛПНП – Липопротеины низкой плотности (Low density lipoprotein)

ЛПОНП – Липопротеины очень низкой плотности (Very Low Density Lipoprotein)

СД – сахарный диабет;

СД2 – сахарный диабет 2 типа;

СРБ – С-реактивный белок

ТГ – триглицериды

цГМФ – cGMP, Cyclic guanosine monophosphate, циклический гуанозинмонофосфат

ЦОГ-1 – циклооксигеназа 1

ЦОГ-2 – циклооксигеназа 2

ВВЕДЕНИЕ

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

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

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

Степень научной разработанности проблемы

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

Обозначенные выше иДПП-4 различаются селективностью к ферменту, некоторыми особенностями метаболического действия и фармакокинетики, эффективными дозами и режимом приема. Второй подход заключается в экзогенном введении синтетических и устойчивых к действию ДПП-4 агонистов глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) (эксенатид, лираглутид, ликсисентид, албиглутид, дулаглутид и другие) [Галстян, К. О., 2016; Шестакова М. В., 2012; Tomlinson B., 2016].

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

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

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

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие **задачи исследования**:

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

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

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

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

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

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

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

Научная новизна работы

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

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

дипиарона предупреждает развитие ожирения у них, вызванное высоким содержанием углеводов и жиров в пище.

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

Методология и методы диссертационного исследования

Исследуемые соединения были получены после анализа научной литературы и проведения патентного поиска среди веществ проявляющих агонистическую активность к GPR119, путем высокопроизводительного скрининга и дальнейшей оценки параметров растворимости, стабильности, безопасности и агонистической активности в *in vitro* исследованиях и гипогликемического действия в условиях *in vivo*. Все исследования *in vivo* выполнены на крысах линии Wistar, острая токсичность соединения лидера дополнительно определялась на нелинейных мышах. На каждом этапе исследования формировались контрольные группы животных. Гипогликемическое действие, влияние соединений на скорость утилизации глюкозы, массу тела, количество потребляемого корма и механизмы действия исследовали на животных с стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным сахарным диабетом и ожирением развивающемся при замене стандартного рациона на высококалорийный и жирный. Церебропротективное действие соединения ZB-16 и его комбинации с метформином изучали на животных острым и хроническим нарушением мозгового кровообращения и стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным сахарным диабетом. Экспериментальные модели патологий были выбраны в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств [Миронов А. Н., 2012; Хабриев Р.У., 2005; Спасов А.А., 2010]. Для решения поставленных задач использовалось современное оборудование и высококачественные расходные материалы. Методы систематизации и статистической обработки полученных

результатов соответствовали рекомендованным для проведения доклинических исследований.

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

Реализация результатов исследования

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

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

Значительная часть диссертационного исследования выполнена в рамках доклинических исследований нового лекарственного средства, для лечения сахарного диабета, на основе агониста GPR119, разрабатываемого по государственному контракту с Минпромторгом РФ № 13411.1008799.154 от 24 июля 2013 года на выполнение научно-исследовательской и опытно-конструкторской работы (НИОКР) «Доклинические исследования лекарственного средства для лечения сахарного диабета 2 типа на основе

агонистов GPR119 рецептора» Шифр «2.1 Диабет ГПР 2013», заключенному в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (утвержденной постановлением правительства РФ от 17.02.2011 г. № 91).

Положения, выносимые на защиту

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

2. Среди изученных агонистов GPR119 соединение ZB-16 сопоставимо по уровню агонистической активности с известными агонистами GPR119, не обладает кардиотоксичностью (по данным исследований *in vitro*), не ингибирует ни одну из изоформ цитохрома P450 (по данным исследований *in vitro*), не обладает общетоксическим действием (по данным исследования острой токсичности *in vivo*) и оказывает выраженное гипогликемическое действие на животных с экспериментальным сахарным диабетом и ожирением сопоставимое по эффективности с метформином и ситаглиптином.

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

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

5. Механизм гипогликемического действия соединения ZB-16 связан с его способностью глюкозозависимо повышать уровень ГПП-1 и

инсулина в крови, увеличивать количество эндокриноцитов, вырабатывающих инсулин, предупреждать апоптоз и стимулировать регенерацию β -клеток поджелудочной железы.

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

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

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

Степень достоверности и апробации результатов

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

Основные материалы диссертации были представлены на международных и российских научных конференциях.

Публикации

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

Объем и структура диссертации

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

Личный вклад автора

Вклад автора заключается в обосновании и выборе направлений исследования, планировании и проведении экспериментов, анализе, интерпритации и обсуждении полученных результатов, написании статей, подготовке их к публикации в научных изданиях. В экспериментальных исследованиях, выполненных в соавторстве, вклад автора является определяющим, состоящим в участии на всех этапах – от постановки задач, разработки протоколов исследования, выполнения экспериментальных работ, обработки и анализа полученных данных, до представления результатов в виде отчетов, публикаций и докладов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Актуальность поиска новых гипогликемических лекарственных средств

Сахарный диабет 2 типа (СД2) является одним из самых распространенных нарушений углеводного обмена. По оценкам ВОЗ в 1980 году диабетом во всем мире страдало 108 млн взрослых людей, а к 2014 году их число достигло 422 млн. Глобальный уровень заболеваемости диабетом (стандартизованный по возрасту) почти удвоился с 1980 года, увеличившись с 4,7% до 8,5% среди взрослого населения.

Согласно статистическим данным (Таблица 1), представленным Министерством здравоохранения РФ, в 2016 году число пациентов с диагнозом сахарный диабет 2 типа увеличилось по сравнению с 2015 годом на 5% и составило 4 239 263 человека, в то же время пациентов с диагнозом ожирение стало больше на 6% (1 825 362 человека). Большинство пациентов, страдающих СД2, составляют взрослые (99,98% – 4 238 552 человека, выше показателей 2015 года на 5%). Угрожающими представляются данные по числу людей с диагнозом ожирение. Так, среди из 1,8 млн человек на долю взрослых приходится 76,55% (1 397 278 человек, выше по сравнению с 2015 годом на 6%), остальные 23,45% это дети, основная часть которых в возрасте до 15 лет (от 0 до 15 лет – 16,75% (305 822 человека, что выше показателей 2015 года на 3%) и от 15 до 17 лет – 6,7% (122 262 человека)). Необходимо отметить, что более чем 63,65% (2 908 111 человек) взрослых с СД2 – это люди пенсионного возраста, т.е. те, которых относят к категории социально незащищенных граждан с зачастую ограниченными материальными ресурсами и наличием сопутствующих заболеваний.

В 2015 году в РФ завершилось крупномасштабное исследование NATION [Дедов И.И., 2016а; Шестакова М.В., 2016], результаты которого

показывают, что реальное число людей, страдающих сахарным диабетом и ожирением, намного больше официальных цифр.

В настоящее время при выборе сахароснижающих препаратов клиницисты уже считают приоритетным не столько выраженность гипогликемического эффекта назначаемого средства, сколько наличие оптимального соотношения гипогликемического эффекта с возможностью снижения риска развития сердечно-сосудистых осложнений, т.к. последние являются основной причиной смерти и инвалидизации пациентов с СД2, а строгий гипогликемический контроль не всегда приводит к снижению частоты их возникновения.

Таблица 1

Статистические данные Министерства здравоохранения РФ по числу заболеваемости населения России сахарным диабетом и ожирением за 2014/15/16 годы

Заболевание	абсолютные числа, (%)			(%)
	2014	2015	2016	2014/15/16
Зарегистрировано больных: всего				
Сахарный диабет:	4184582	4418305	4610796	6/4%
I типа	310177	320021	323952	3/1%
II типа	3836493	4052987	4239263	6/5%
Ожирение	1557323	1726908	1825362	11/6%
Зарегистрировано больных: взрослые				
Сахарный диабет:	4150412 (99,18%)	4380735 (99,15%)	4569063 (99,09%)	6/4%
I типа	277248 (89,38%)	283753 (88,67%)	283475 (87,51%)	2/0%
II типа	3835834 (99,98%)	4052350 (99,98%)	4238552 (99,98%)	6/5%
Ожирение	1179082 (75,71%)	1312559 (76,01%)	1397278 (76,55%)	11/6%
Зарегистрировано больных старше трудоспособного возраста с 55 лет у женщин и с 60 лет у мужчин*				
Сахарный диабет:	2724787 (65,65%)	2873718 (65,6%)	3023425 (66,17%)	5/5%

I типа	87239 (2,1%)	89325 (2,04%)	83491 (1,83%)	2/-7%
II типа	2596621 (62,56%)	2749265 (62,76%)	2908111 (63,65%)	6/6%
Ожирение	517215 (12,46%)	574583 (13,12%)	602762 (13,19%)	11/5%
Зарегистрировано больных: дети (0 – 14 лет)				
Сахарный диабет:	24070 (0,58%)	26827 (0,61%)	29881 (0,65%)	11/11%
I типа	23409 (7,55%)	26054 (8,14%)	29185 (9,01%)	11/12%
II типа	315 (0,01%)	324 (0,01%)	352 (0,01%)	3/9%
Ожирение	270352 (17,36%)	297001 (17,2%)	305822 (16,75%)	10/3%
Зарегистрировано больных: дети (15 – 17 лет)				
Сахарный диабет:	10100 (0,24%)	10743 (0,24%)	11852 (0,26%)	6/10%
I типа	9520 (3,07%)	10214 (3,19%)	11292 (3,49%)	7/11%
II типа	344 (0,01%)	313 (0,01%)	359 (0,01%)	-9/15%
Ожирение	107889 (6,93%)	117348 (6,8%)	122262 (6,7%)	9/4%

Примечание: * % Зарегистрированных больных старше трудоспособного возраста (с 55 лет у женщин и с 60 лет у мужчин) отражает долю от числа взрослых

В большинстве случаев избыточная масса тела и ожирение предшествуют развитию СД2. Причинами увеличения массы тела в основном являются неправильное или несбалансированное питание, употребление в пищу большого количества углеводов, в том числе в виде сахаросодержащих напитков (ВОЗ в 2008 году ввела программу по глобальному сокращению потребления этого вида продуктов питания [Darnton-Hill I., 2014]), отсутствие регулярных физических нагрузок и образ жизни, способствующий ухудшению здоровья. Важно отметить, что уменьшение массы тела значительно снижает тяжесть течения СД2, а также снижает риск развития сердечно-сосудистых и онкологических осложнений, которые, по данным ВОЗ, в совокупности являются ведущей причиной смертности населения [ВОЗ, 2016].

Эффективная профилактика сердечно-сосудистых заболеваний у больных СД становится приоритетной целью лекарственной терапии, не уступающей по значимости задаче поддержания оптимального гликемического контроля. В некоторых исследованиях [Johnston S.S., 2011] было обнаружено, что чрезмерное стремление врача и/или пациента в короткие сроки установить строгий контроль гликемии, в том числе за счет интенсификации сахароснижающей терапии, может негативно сказываться на сердечно-сосудистой системе. Данное наблюдение можно объяснить тем, что интенсификация сахарснижающей терапии приводит к повышению риска развития гипогликемии, возникновение которой провоцирует активацию контринсулярной системы. Эпизодическая гипогликемия вызывает компенсаторный выброс адреналина и глюкагона, которые приводят к гипергликемии и увеличивают нагрузку на сердечно-сосудистую систему, что в условиях сопутствующей диабету эндотелиальной дисфункции может спровоцировать нарушение кровоснабжения различных органов и привести к инфаркту миокарда, инсульту и другим острым состояниям, связанным с нарушением кровообращения. Риск развития инфаркта и инсульта у взрослых людей с диабетом в 3-7 раз выше, чем у людей без нарушений углеводного обмена [Гудкова В.В., 2015; Гусев Е.И., 2014]. Снижение кровотока в нижних конечностях в сочетании с повреждением нервных волокон повышает вероятность появления язв и ампутации пораженной конечности. Диабетическая ретинопатия, которая развивается в результате длительного накопления повреждений мелких кровеносных сосудов сетчатки [Bourne R.R., 2013], также является ведущей причиной потери зрения у больных СД. Наличие СД является одним из основных факторов, приводящих к развитию нефропатии [Bethesda M.D., 2014]. Общий риск смерти среди людей с диабетом как минимум в 2 раза выше, чем среди людей того же возраста без диабета [ВОЗ, 2013].

Качество жизни пациентов с СД в большинстве случаев остается низким, поскольку необходимость соблюдения диеты, изменения пищевых

привычек, увеличения физической активности, приема медикаментов и проведения мониторинга гликемии в значительной степени ограничивает их свободу действий и возможности. Опасения пациентов, связанные с усугублением их здоровья в результате прогрессирования заболевания, развития микро- и макроангиопатий в совокупности с низким качеством жизни, приводя к появлению дистоний, которые в последующем могут развиваться в депрессивные расстройства. Так, Европейская диабетическая ассоциация (EASD) в 2016 году опубликовала отчет, согласно которому в РФ депрессия у пациентов с СД встречается в 17% случаев, что значительно больше этого показателя в Китае (10,8%), Италии (3,9%) и Индии (2,0%).

Понимание пациентом его болезни, ее причин, особенностей течения, ее последствий, а также целей и стратегий терапевтических вмешательств является одним из ключевых факторов, без должного внимания к которому невозможно добиться эффективной компенсации нарушений углеводного обмена и предупредить осложнения СД. Большинство пациентов с СД2 относятся к числу социально неблагополучных или незащищенных граждан, у которых дополнительно отмечаются разные по виду и выраженности когнитивные нарушения. Наличие социально-психологических проблем у пациентов с СД2 существенно осложняет процесс адекватного взаимодействия между врачом и пациентом. В результате пациент до конца не понимает сложность и опасность своего заболевания, важность диагностических процедур и самодиагностики, необходимость изменения образа жизни и строгого исполнения рекомендаций/назначений лечащего врача. Зачастую пациенты с СД2 отличаются низкой приверженностью к лечению. Многие пациенты в силу тяжелых когнитивных нарушений забывают принимать лекарственные препараты или не способны точно их дозировать (инсулин). Все выше обозначенное приводит к снижению эффективности лечения, прогрессированию заболевания и увеличению риска развития его осложнений.

Сахарный диабет является тяжелым экономическим бременем, как для пациента (ввиду снижения эффективности его профессиональной деятельности, увеличения расходов на восстановление и поддержания здоровья), так и для государства, поскольку рост числа пациентов с этим диагнозом неизбежно приведет к снижению производительности труда и расширению расходов на стационарное или амбулаторное лечение. Тяжелая экономическая ситуация, связанная с ростом числа пациентов, осложняется постоянным увеличением стоимости диагностики и средств лечения сахарного диабета (в основном, препаратов инсулина). Таким образом, сахарный диабет представляет собой заболевание, которое по своим медико-социальным и экономическим последствиям является важной проблемой, решение которой может стать одной из ключевых задач медико-социальных служб ведущих государств мира.

В работе King H [King H., 1998] с соавторами, опубликованной в 1998, были высказаны, на тот момент времени, казавшиеся пессимистичными прогнозы в отношении увеличения числа пациентов с этим диагнозом к 2025 году с 135 до 300 млн. Учитывая современные реалии, можно сказать, что они оказались излишне оптимистичными.

1.2. Классификация сахарного диабета

В соответствии с современными представлениями [DeFronzo, 2015] СД представляет собой гетерогенное заболевание, характеризующееся нарушением обмена веществ, повышением концентрации глюкозы в крови, с инсулинрезистентностью или без нее, с относительной или абсолютной недостаточностью секреции инсулина [Дедов И. И., 2017]. Основным клиническим проявлением, патогенетическим фактором и причиной возникновения осложнений является гипергликемия. СД принято классифицировать по нескольким признакам:

1. секреция инсулина

У СД1 она отсутствует

У СД2 она изменена

2. этиология заболевания:

- генетические дефекты, приводящие к дисфункции β -клеток;
- генетические причины нарушения функционирования инсулина;
- заболевания экзокринной части поджелудочной железы;
- наличие некоторых патологий эндокринной системы;
- токсическое действие некоторых лекарственных средств;
- некоторые инфекционные заболевания;
- необычные формы иммунологически опосредованного СД;
- генетические синдромы, которые могут сопровождать СД;
- гестационный диабет.

СД 1-го типа (СД1) возникает в результате аутоиммунного разрушения β -клеток поджелудочной железы. Маркеры иммунной деструкции β -клеток присутствуют на момент постановки диагноза у 90% пациентов и включают появление антител к островковым клеткам поджелудочной железы (ICA), тирозинфосфатазе (anti-IA-2), глутаматдекарбоксилазе (anti-GAD) или инсулину (IAA). Возникновение СД1 наиболее вероятно у детей и подростков, значительно реже развивается у взрослых людей. Скорость разрушения β -клеток у детей и подростков, как правило, выше, чем у людей средних лет, у которых аутоиммунный процесс разрушения островков Лангерганса носит латентный и длительно бессимптомный характер (LADA – латентный аутоиммунный диабет взрослых), что и обуславливает более интенсивное течение заболевания в раннем возрасте, манифестирующего чаще в форме кетоацидотической комы или близких к ней состояний.

С прогрессом заболевания дисфункция β -клеточного аппарата нарастает, что приводит к возникновению абсолютного дефицита инсулина. Основная проблема СД2 скрывается не только в его длительном бессимптомном течении и прогрессирующем недостатке секретируемого инсулина, но и в постепенно развивающейся инсулинорезистентности,

наличие которой в будущем существенно ограничивает возможности медикаментозной коррекции.

Гестационный сахарный диабет (ГСД) определяется как нарушение толерантности к глюкозе, которое впервые выявляется во время беременности, в большинстве случаев в третьем триместре. Этот тип диабета осложняет около 8–9% всех беременностей, риск развития повышается при наличии рисков развития СД2 [Дедов И.И., 2017].

1.3. Патогенетические аспекты гипергликемии

Классические взгляды на патогенез СД объясняют развитие гипергликемии, ведущего лабораторного симптома заболевания, возникновением абсолютной инсулиновой недостаточности (снижением продукции инсулина β -клетками поджелудочной железы) и развитием периферической резистентности к действию инсулина, что сопровождается снижением утилизации глюкозы [DeFronzo, 2015].

Недостаточная продукция инсулина, помимо непосредственной гибели β -клеток, может быть связана с рядом других причин. Например, нарушения инкретиновой сигнализации (недостаточная продукция инкретинов L-клетками кишечника, снижение чувствительности рецепторов к глюкозозависимому инсулинотропному полипептиду (ГИП)) будут препятствовать экзоцитозу инсулина. Избыточная продукция глюкагона, вызванная увеличением количества α -клеток поджелудочной железы, также будет приводить к относительной недостаточности инсулина.

Развитие периферической резистентности к действию инсулина может быть вызвано процессами системного воспаления, которые активизируются при участии жировой ткани (липотоксичность).

Еще одним значимым фактором, способствующим развитию гипергликемии при СД, становится повышение почечной реабсорбции глюкозы.

Нарушение секреции инсулина, повышение продукции глюкозы печенью и снижение периферической утилизации глюкозы – это ряд основных дефектов, ответственных за развитие и прогрессирование СД2. Однако патофизиология этого заболевания также включает в себя резистентность к инсулину адипоцитов (увеличение липолиза), снижение секреции инкретинов или чувствительности к ним, повышенную секрецию глюкагона, повышение почечной реабсорбции глюкозы, нейромедиаторную дисфункцию и инсулинорезистентность в головном мозге (Рисунок 1). Текущее управление диабетом фокусируется на снижении уровня глюкозы в крови, в то же время одной из целей терапии этого заболевания должно быть замедление его прогрессирования и снижение риска развития или тяжести осложнений. Современные подходы к лечению ставят своей целью устранение нескольких патофизиологических дефектов, присутствующих при СД2, однако их стоимость и частые нежелательные явления, возникающие на фоне их применения, делают их недоступными для большинства пациентов. Оптимальное управление гипергликемией должно включать раннее начало комбинированной терапии с использованием нескольких препаратов с различными механизмами действия.

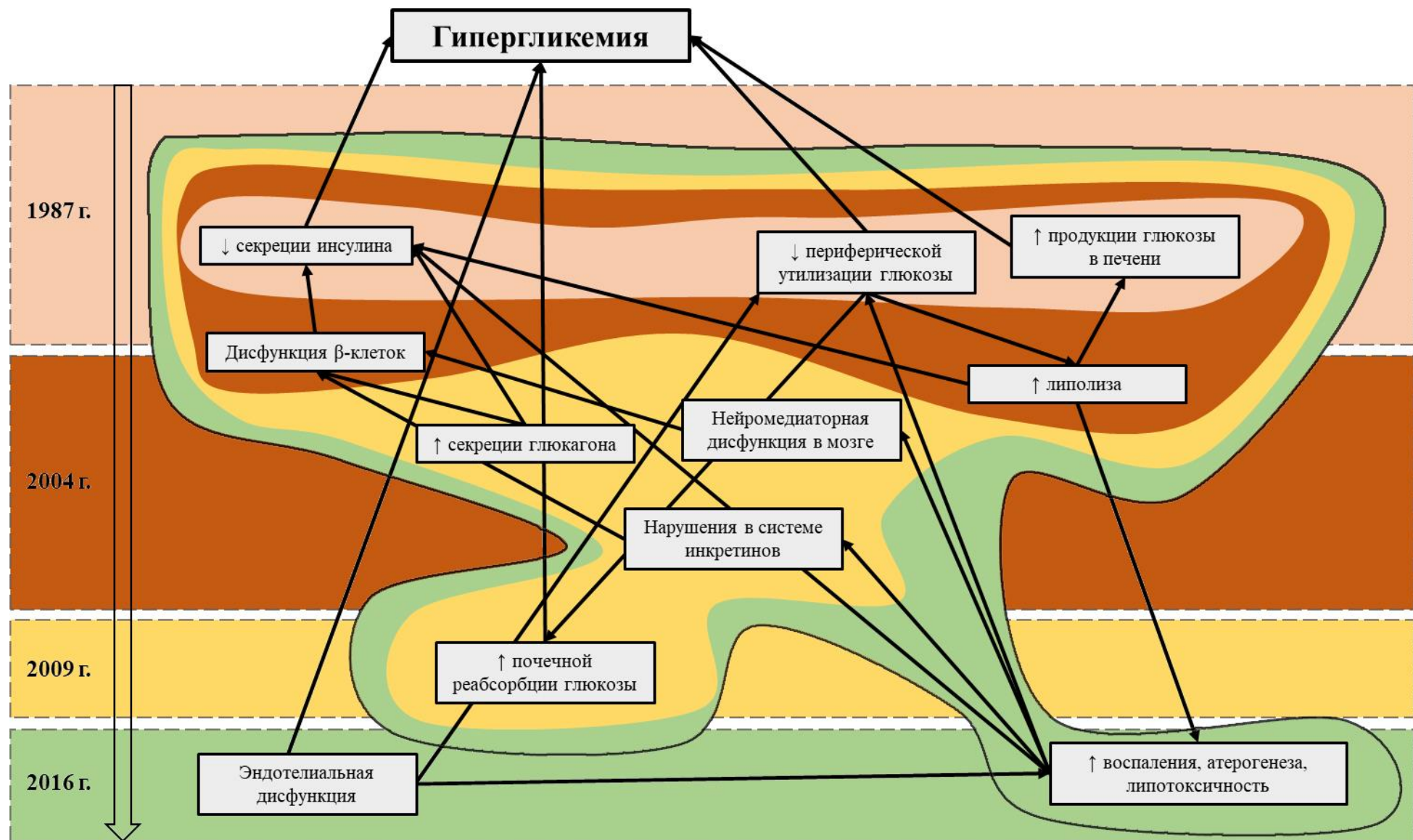


Рисунок 1. Эволюция представлений о патогенезе сахарного диабета

1.4. Современная фармакотерапия СД2

Фармакотерапевтические подходы к лечению СД в настоящее время претерпевают ряд существенных изменений. Так, последнее десятилетие ознаменовалось выходом на мировой фармацевтический рынок совершенно новых фармакотерапевтических групп лекарственных средств и терапевтических стратегий ведения пациентов с СД2. Если до середины 90-х годов прошлого века в России из пероральных сахароснижающих препаратов врачам и пациентам были доступны только метформин, производные сульфонилмочевины и тиазолидиндионы, то в 2000 г. уже стали появляться глиниды, в 2005 г. появился первый ингибитор ДПП-4, затем появились агонисты ГПП-1 рецептора и одной из последних зарегистрированных групп стали ингибиторы натрий-глюкозного ко-транспортера второго типа (ингибиторы SGLT2). В настоящее время FDA одобрены 12 классов препаратов для лечения СД2 (табл.2), в национальные рекомендации РФ включены все, кроме секвестрантов желчных кислот, агонистов дофамина и аналога амилаина.

Таблица 2

Лекарственные препараты для лечения СД2

<i>Класс лекарственных средств</i>	<i>Механизм действия</i>	<i>Дата одобрения первого представителя данного класса</i>	<i>Комментарии</i>
Бигуаниды; метформин	Повышает чувствительность к инсулину, подавляет выработку глюкозы в печени	1957 (Europe), 1995 (FDA)	На фоне применения могут отмечаться: желудочно-кишечные побочные эффекты, молочный ацидоз. Противопоказан при почечной недостаточности
Производные сульфонилмочевины 2-го и 3-го поколения: глимепирид, глипизид, гликлазид, глибенкламид,	Стимуляция секреции инсулина поджелудочной железой	Glibenclamide (Glyburide): 1969 (Europe), 1984 (FDA)	На фоне применения высокий риск гипогликемии. Увеличение массы тела

ГЛИКВИДОН			
Глиниды: репаглинид, натеглинид	Стимуляция секреции инсулина поджелудочной железой	Repaglinide: 1998 (EMA), 1997 (FDA)	Короткий период полувыведения. На фоне применения высокий риск гипогликемии. Увеличение массы тела.
Тиазолидиндионы: пиоглитазон, росиглитазон	Снижение резистентности к инсулину, активация рецептора PPAR γ	Rosiglitazone: 1999 (FDA), 2000 (EMA)	На фоне применения высокий сердечно- сосудистый риск (росиглитазон), рак мочевыводящего пузыря (пиоглитазон). Задержка жидкости, увеличение массы тела, переломы костей
Ингибиторы α- глюкозидазы: акарбоза, миглитол, вокарбоза	Снижение абсорбции глюкозы в кишечнике	Акарбоза: 1991 год (Европа), 1995 год (FDA)	На фоне применения высокий риск развития желудочно- кишечных побочных эффектов, отсутствие системных эффектов
Ингибиторы ДПП-4: ситаглиптин, вилдаглиптин, саксаглиптин, линаглиптин, алоглиптин	Стимуляция глюкозо-зависимой выработки инсулина и подавление выработки глюкагона за счет продлонгации действия эндогенного ГПП-1 (незначительные эффекты на перистальтику и чувство насыщения)	Sitagliptin: 2006 (FDA), 2007 (EMA); (Vildagliptin одобрен только EMA, 2008). Saxagliptin одобрен FDA и EMA, 2009. linagliptin 2011 (FDA), alogliptin 2013 (FDA)	Опасения по поводу риска развития медуллярного рака щитовидной железы, панкреатита или рака поджелудочной железы не были подтверждены в клинических испытаниях и по FDA и EMA

ГПП-1-агонисты: эксенатид, лираглутид, эксенатид продлен релиз, ликсисенатид, альбиглутид, дулаглутид	Стимуляция глюкозо-зависимой выработки инсулина, подавление синтеза глюкагона, снижение перистальтики желудочно- кишечного тракта, повышение чувства сытости, снижение массы тела	эксенатид: 2005 (FDA), 2006 (EMA); лираглутид 2010 (FDA), 2009 (EMA), эксенатид ER 2012 (FDA), (только ликсисенатид одобрен EMA, 2013) альбиглутид 2014, дулаглутид 2014 (FDA)	Только для инъекций, опасения по поводу риска развития медуллярного рака щитовидной железы, панкреатита или рака поджелудочной железы не были подтверждены в клинических испытаниях и по FDA и EMA
Ингибиторы SGLT2: дапаглифлозин, канаглифлозин, эмпаглифлозин	Снижение почечного порога для выделения глюкозы	дапаглифлозин: 2012 (EMA), 2014 (FDA). канаглифлозин 2013 (FDA), эмпаглифлозин 2014 (FDA, EMA)	На фоне применения возможны генитальные инфекции, мочегонные эффекты, снижение массы тела
Секвестранты желчных кислот	Препятствует резорбции желчных кислот из кишечника	Colesevelam: 2008 (FDA); EMA не одобрило для лечения диабета	Препарат для снижения уровня липидов с дополнительным эффектом снижения уровня глюкозы
Агонисты дофамина: бромокриптин	Центральная модификация инсулиновой резистентности	Bromocriptin: 2009 (FDA), EMA не одобрило для лечения диабета	На фоне применения возможна ортостатическая гипотония, тошнота
Amylin аналог: прамлинтид	Замедление опорожнения желудка, подавление секреции глюкагона, стимуляция чувства насыщения	Pramlintide: 2005 (FDA), EMA не одобрило	Одобен для лечения диабета типа 1 и 2 с другими антидиабетическими препаратами. На фоне применения возможна тошнота, гипогликемия
Инсулин: человеческий инсулин, инсулин НПХ, инсулин аспарта, инсулин Лизпро, инсулин гларгин, инсулин Детелир, инсулин левемир	Снижение уровня глюкозы в крови	Regular insulin: 1982 (FDA); 1984 (Europe); Bovine insulin: 1922	На фоне применения высокий риск гипогликемии. Увеличение массы тела

Инсулин является наиболее эффективным средством для снижения уровня глюкозы, однако его применение нередко сопровождается развитием гипогликемических состояний и увеличением массы тела. Неинсулиновые

противодиабетические препараты снижают гликозилированный гемоглобин HbA_{1c} в среднем на 1%, при этом одновременное использование двух или более препаратов с различными механизмами действия может приводить к более значимым снижениям HbA_{1c}. Однако применение комбинированной терапии усложняет лечение СД и увеличивает риск побочных эффектов, что впоследствии приводит к снижению комплаентности пациентов.

Лидеры всех мировых ассоциаций по диагностике и лечению СД, в том числе Американская ассоциация диабета (ADA) 2017 Standards of Medical Care in Diabetes [ADA, 2017] и Российская «Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом 2017» [Дедов И.И. 2017], рекомендуют метформин в качестве препарата первого ряда для лечения СД₂, при этом важным моментом общей терапии также является модификация образа жизни пациента. При непереносимости (или противопоказаниях к метформину) в качестве монотерапии могут быть назначены средства с минимальным риском развития гипогликемии (иДПП-4, аГПП-1, ингибиторы SGLT2). При непереносимости или противопоказаниях к препаратам первого ряда рекомендуется использование альтернативных классов сахароснижающих препаратов (иДПП-4, аГПП-1, тиазолидиндионы, препараты сульфонилмочевины) [Дедов И.И., 2017]. Необходимо также отметить, что лекарственные препараты, используемые в настоящее время для терапии СД, обладают различной стоимостью, многие из них (аГПП-1, ингибиторы SGLT2) оказываются недоступными для большинства пациентов. Важно, чтобы подход к выбору назначаемых препаратов учитывал, как эффективность ЛС, их дополнительные положительные свойства, так и стоимость, возможные побочные эффекты, включая увеличение массы тела, сопутствующие заболевания, риск гипогликемии и предпочтения пациента. Таким образом, выбор гипогликемического лекарственного средства базируется на оценке его фармакотерапевтических свойств: активности, безопасности (в первую очередь в отношении гипогликемии и влияния на массу тела), способности

снижать риски развития сердечно-сосудистых заболеваний и стоимости лечения для пациента.

Можно предположить, что новые лекарственные препараты должны иметь улучшенный профиль безопасности и переносимости, сфокусированный на преодолении известных побочных эффектов зарегистрированных противодиабетических средств. Желательно, чтобы препараты для лечения СД2 не вызывали желудочно-кишечные побочные эффекты, развития гипогликемии, не увеличивали массу тела, риск развития сердечно-сосудистых осложнений, переломов и отеков, способствовали приверженности к лечению.

Широко применяющиеся группы гипогликемических средств не всегда эффективны, их использование сопровождается проявлениями нежелательных эффектов: гипогликемией (инсулин и его аналоги, производные сульфонилмочевины, меглитиниды, миметики амилина и др.); повышением массы тела (инсулины, производные сульфонилмочевины, меглитиниды); желудочно-кишечными расстройствами (метформин, ингибиторы α -глюкозидазы, аГПП-1, миметики амилина (прамлинтид), секвестранты желчных кислот (колесевелам), агонисты дофаминовых рецепторов D₂; метаболическими нарушениями – лактат-ацидоз и B₁₂-дефицитная анемия (метформин), триглицеридемией (секвестранты желчных кислот), задержкой жидкости, отеками (тиазолидиндионы) и многими др. По мере развития заболевания возникает необходимость проведения комбинированной терапии СД, что повышает риск возникновения описанных выше эффектов.

Синтетические аналоги ГПП-1, ингибиторы фермента ДПП-4 и блокаторы SGLT2 в настоящее время занимают лидирующие показатели по числу исследований их эффективности и безопасности при назначении пациентам с СД2. Различные представители указанных фармакологических групп являются одними из самых перспективных лекарственных средств для лечения СД2. При этом необходимо отметить, что эти препараты не

повышают риск развития гипогликемии, не влияют или снижают массу тела пациентов и риск развития сердечно-сосудистых событий.

Учитывая вышесказанное очевидной представляется высокая актуальность разработки новых сахароснижающих препаратов и особенно, обладающих новым механизмом действия и фармакологическими мишенями.

1.5. Обзор рынка гипогликемических лекарственных средств¹

По данным аналитических компаний российский фармацевтический рынок является развивающимся и расширяющимся. Учитывая число пациентов с диагнозом СД, мы сочли целесообразным проанализировать структуру и объем рынка гипогликемических лекарственных средств.

Современная фармакотерапия СД включает в себя препараты практически всех фармакологических групп, принадлежащих разным ценовым категориям и доступных в нескольких лекарственных формах. Точный объем такого масштабного фармацевтического рынка, как российский, подсчитать не представляется возможным ввиду наличия объективных причин. Всего за 2016 год из аптек было реализовано свыше 24,5 млн, упаковок гипогликемических лекарственных средств (Приложение 26), при этом они были закуплены аптеками на сумму, превышающую 8 244 млн, рублей. Из аптек гипогликемических препаратов за 2016 год продано на сумму, превышающую 9 960 млн рублей, а средняя цена гипогликемического средства составляла от 33 (глибенкламид) до 23,3 тысяч рублей (лираглутид, Саксенда) за упаковку. Чуть меньше, чем 90% проданных упаковок приходится на препараты, содержащие только метформин или его лекарственную форму длительного действия и производные сульфонилмочевины 2-го (в большей степени) и 3-го (в меньшей) поколения. Очевидно, что большой охват рынка этими препаратами продиктован их низкой стоимостью, которая для большинства торговых наименований не превышает 500 рублей, а также длительностью присутствия во врачебной практике и на фармацевтическом рынке. Доступность метформина безусловно благоприятно влияет на терапию СД и сопутствующих ему заболеваний, но широкое распространение производных сульфонилмочевины

¹ Данные предоставлены сотрудниками DSM Group (занимается мониторингом фармацевтического рынка) за что выражаем им искреннюю благодарность

может иметь негативное последствие, поскольку применение этих препаратов сопряжено с высоким риском развития гипогликемических состояний, существенно осложняющих терапию и ухудшающих прогноз. Необходимо отметить, что метформин является, с экономической точки зрения, самым доступным препаратом на фармацевтическом рынке России. Так, минимальная средневзвешенная цена за упаковку препарата Форметин (метформин) в таблетках 1 г №30, выпускаемого компанией ОАО «Фармстандарт», составила 112,78 рублей, а максимальная 344,7 рублей за упаковку препарата Глюкофаж Лонг в таблетках по 750 мг №30, выпускаемого компанией «MERCK SANTE S.A.S.» (Приложение 26).

Ингибиторы ДПП-4 (Приложение 12-15, 26) за 2016 год были реализованы в количестве, превышающем 1 490 тысяч упаковок на сумму 1 670 млн рублей от дистрибьюторов и на 1 996 млн рублей из аптек. Средневзвешенная цена препаратов этой группы, за исключением Алоглиптина (Випидия таблетки п/о 12,5 мг №28), производимым компанией TAKEDA (964,16), и Вилдаглиптина (Галвус таблетки 50 мг №28), производимым компанией NOVARTIS (665,96) превышает 1200 рублей за упаковку. Необходимо отметить, что наиболее продаваемые препараты этой фармакотерапевтической группы стали Вилдаглиптин (продажи препарата Галвус составили 617 434 упаковки) и его комбинация с метформином (продажи препарата Галвус Мет составили 633 098 упаковок), что указывает на выраженную зависимость количества реализованных лекарственных средств от их стоимости. В то же время продажи первого зарегистрированного представителя этой группы препаратов – ситаглиптина, под торговым наименованием Янувия (таблетки п/о 100 или 50 мг №28, MERCK SHARP & DOHME), и его комбинации с метформином – Янумет (таблетки п/о 50 мг+1000/850/500 мг №56, MERCK SHARP & DOHME) составили в сумме 62 307 и 53 533 упаковки, что, очевидно связано с высокой стоимостью, которая составила в среднем 1 699,09 рублей и 2 355,01 рублей за упаковку соответственно (Приложение 27).

Препараты инсулина и его аналогов продолжают приобретаться населением и занимают свыше 3,5% объема рынка в упаковках и свыше 11% в денежном выражении. Эта фармакотерапевтическая группа представлена 15 подгруппами препаратов и 34 торговыми наименованиями, которые были реализованы аптекам на сумму в 948 279 295 рублей и на 1 123 630 634 рубля населению. Всего препаратов, содержащих инсулин и его аналоги, за 2106 год было реализовано 940 549 упаковок, а средневзвешенная цена составила 1 220,12 рублей. Таким образом, препараты инсулина занимают 4-е место по уровню реализации гипогликемических лекарственных средств на российском фармацевтическом рынке, как в денежном, так и в натуральном выражении, что говорит о недостаточном финансировании системы предоставления льгот на получение препаратов инсулина и его аналогов гражданам РФ.

Наиболее перспективные, эффективные и безопасные гипогликемические препараты, фармакологические свойства и терапевтические эффекты которых продолжают активно изучаться, а именно синтетические аГПП-1 (эксенатид, ликсисенатид, 2 препарата содержащих разные дозы лираглутида) и ингибиторы SGLT2 (эмпа-, дапа- и канаглифлазин) были реализованы в меньшем количестве товарных единиц. Очевидно, это связано с их высокой стоимостью, неудобной лекарственной формой, возникновением нежелательных явлений в результате их применения и относительной новизной. Совокупный объем продаж препаратов представителей этих 2 групп занимает только 0,53% от всего количества проданных торговых единиц, но из-за высокой стоимости в денежном выражении их продажи составили чуть больше 5% от совокупного оборота всех гипогликемических лекарственных средств (Приложение 28).

Лидером по количеству проданных товаров на коммерческом фармацевтическом рынке препаратов, относящихся к группе аГПП-1, является лираглутид, реализуемый под торговым названием Виктоза (р-р д/и 6 мг/мл 3 мл №2,) компанией NOVO NORDISK. Так, в натуральном

выражении за 2016 год в розничном сегменте фармацевтического рынка России было реализовано 17 394 упаковки этого препарата на сумму 159 463 187 рублей для аптек и 194 952 411 рублей для потребителей. Другой представитель этой группы – препарат Саксенда (лираглутид, р-р д/и 6 мг/мл 3 мл), но зарегистрированный по несколько другим показаниям и схеме применения был реализован в значительно меньшем количестве (за 2016 год реализовано всего 50 торговых единиц), на сумму 1 174 124 рубля для аптек и 1 411 517 рублей для населения.

Относительно низкая популярность препарата Саксенда, очевидно, является следствием его высокой стоимости, превышающей Виктозы более чем в 2 раза. Так, средневзвешенная цена Саксенды равняется 23 316,245, а Виктозы 9 221,365 рублей.

Гипогликемические лекарственные средства, относящиеся к производным сульфонилмочевины, продолжают быть одними из самых широко применяемых, несмотря на высокий риск развития гипогликемических состояний, что, очевидно, связано с их низкой стоимостью и длительностью присутствия на рынке (применяется с 1969 года). За 2016 год на коммерческом (аптечном) фармацевтическом рынке было реализовано 11 232 340 упаковок препаратов, содержащих в своем составе производные сульфонилмочевины, на сумму 2 771 845 915 и 3 406 651 929 рублей для аптек и пациентов соответственно. Как уже отмечалось выше, препараты, относящиеся к этой группе, являются самыми доступными населению.

Наиболее продаваемыми препаратами этой группы, как в натуральном, так и в денежном отношении, стали содержащие гликлазид. На российском фармацевтическом рынке они представлены 10 торговыми наименованиями (Глидиаб, Глизид, Гликлада, Гликлазид, Диабеталонг, Диабетон, Диабефарм МВ, Диабефарм, Предиап, Глимекомб (комбинированная форма глипизиды и метформина)), их совокупный объем реализации составил 5 305 900 в натуральном, 1 246 040 381 и 1 510 754 940 в денежном выражении для аптек

и пациентов соответственно. Необходимо отметить, что основная доля продаж этой группы препаратов приходится на препарат Диабетон (таблетки 30/60 мг №60/30, SERVIER), который за 2016 год был реализован в количестве 4 428 294 упаковки на сумму 1 132 906 149 и 1 371 083 511 рублей для аптек и пациентов соответственно, а средневзвешенная цена этого препарата составила 258 рублей и уступала лишь единственному комбинированному с метформином гликлазиду – препарату Глимекомб (таблетки 40 мг+ 500 мг №30/60, ОАО ХФК АКРИХИН), цена которого составила чуть больше 300 рублей за упаковку.

Препараты, содержащие в своем составе глибенкламид (Глибенкламид, Маниглит, Манинил), в том числе и в комбинации с метформином (Багомет плюс, Глибомет, Глюкованс, Глюконорм, Метглитб, Метглитб форс), за 2016 год были реализованы в количестве 4 779 546 упаковок общей стоимостью для аптек 922 891 842 рубля и для пациентов 1 151 089 243 рубля. При этом в основном продавались препараты 3 торговых наименований – Манинил (таблетки 1.75/3,5/5 мг, №120 A.MENARINI PHARMACEUTICAL INDUSTRY'S GROUP LTD), Глибомет (таблетки п/о 2,5 (глибенкламид) мг+400 (метформин) мг, №40, A.MENARINI PHARMACEUTICAL INDUSTRY'S GROUP LTD) и Глюкованс (таблетки п/о 500 (метформин) мг+2.5 (глибенкламид) мг, №60, MERCK SANTE S.A.S.).

Одним из препаратов, занимающим значимую долю в объеме реализации гипогликемических препаратов на основе производных сульфонилмочевины, составляющих кластер средств, содержащих глемеипирид, является Амарил (таблетки 4 или 3 мг №90 и таблетки 1; 2; 3 и 4 мг №30 или его комбинация с метформином 1 мг + 250 мг №30 и 2 мг + 500 мг №30, SANOFI-AVENTIS). За 2016 год на коммерческом рынке было реализовано 675 070 упаковок (524 398 и 150 672 для моно и комбинированных препаратов соответственно) на сумму 481 977 652 (399 245 298 и 82 732 354 соотв.) рубля для аптек и 591 065 382 (490 408 808 и 100 656 574 соотв.) рубля для пациентов. Всего препаратов, в состав

которых входит глемипирид, было продано 1 016 822 упаковок на сумму 554 418 353 и 685 819 493 рубля соответственно для аптек и пациентов.

Таким образом, основная доля продаж гипогликемических лекарственных средств, содержащих производные сульфонилмочевины, приходится на гликлазид, глибенкламид (в том числе в комбинации с метформином) и глемипирид. В основном, препараты, содержащие эти вещества, производятся иностранными компаниями, но за некоторым исключением являются одними из самых доступных для населения ввиду низкой стоимости. В то же время трудно объяснить сравнительно низкий уровень реализации препаратов этой группы, комбинированных с метформином, поскольку их стоимость сопоставима, а противодиабетический эффект выше.

Коммерческий рынок гипогликемических препаратов, в состав которых входит метформин, в большей степени представлен монопрепаратами, объем реализации которых превалирует как в натуральном, так и в стоимостном выражении. Так, препараты, содержащие только метформин, включая его пролонгированную форму, за 2016 год были проданы в количестве 11 043 693 упаковки на суммы 2 429 631 067 и 2 926 881 923 рубля для аптек и пациентов соответственно. В то время как его комбинации были реализованы в количестве 3 838 016 в натуральном, 1 850 772 303 и 2 271 434 263 в денежном выражении для аптек и пациентов соответственно. Такая разница может быть вызвана более чем в пять раз отличающейся средневзвешенной ценой на моно- и комбинированные препараты (за исключением его комбинаций с препаратами сульфонилмочевины) метформина, которая различается почти в 9 раз. Так, средневзвешенная цена для препарата метформин и его пролонгированной формы составляла 186,03 рубля, а для его комбинаций (за исключением с препаратами сульфонилмочевины, для которых она составила 252,60 рубля) составила 1751,39 рублей. Столь четкая ассоциация объема потребления от стоимости подтверждает, что, с одной стороны, СД чаще возникает у людей, относящихся

к социально незащищенным слоям населения, а с другой – что его фармакотерапия современными гипогликемическими средствами доступна не многим.

Государственный сектор фармацевтического рынка гипогликемических препаратов, по объемам реализации, как в натуральном, так и в денежном выражении значительно скромнее коммерческого. Так, государственными учреждениями было закуплено 6 455 205 упаковок гипогликемических препаратов на сумму 3 161 341 788 рублей, что в 3,8 (6 455 205 против 24 857 185) и 2,6 (3 161 341 788 против 8 244 384 494) раз меньше объемов, закупленных коммерческими аптечными организациями в натуральном и денежном отношении соответственно. Такая разница между закупками гипогликемических лекарственных средств свидетельствует о недофинансировании государственного сектора. Анализ состава государственного сектора рынка гипогликемических лекарственных средств показал, основная его часть в натуральном выражении приходится на препараты производных сульфонилмочевины, которых было закуплено 2 849 586 (44,14%) на сумму 488 639 535 (15,46%) рублей. При этом большая часть этих сумм приходится на препараты, содержащие гликлазид (1 864 308 упаковок на сумму 269 760 039 рублей), глибенкламид и метформин (503 319 упаковок на сумму 104 363 289 рублей).

Препаратов, содержащих только метформин, включая его пролонгированную форму, было закуплено в количестве 1 716 036 (26,58%) упаковок на сумму 322 091 406 (10,19%) рублей. Объем закупки препаратов инсулина и его аналогов за 2016 год составил 1 656 636 (23,17%) в натуральном и 2 042 081 034 (58,73%) в денежном выражении.

Ингибиторы ДПП-4 замыкают четверку лидеров закупок и которые образуют основной ассортимент, как коммерческого, так и государственного сектора гипогликемических лекарственных средств. Объем закупки ингибиторов ДПП-4 составил 222 117 (3,44%) упаковок на сумму 265 428 951 (8,4%) рубль, в основном приходящийся на препараты, содержащие вилдаглиптин в

комбинации с метформином (106 263 упаковки на сумму 152 437 953 рубля) и только вилдаглиптин (85 401 упаковка на сумму 57 295 248 рублей).

При этом необходимо отметить, что средневзвешенная цена закупок для коммерческого (Приложения 16-19) и государственного сектора (Приложения 20-23) не существенно, но отличаются. Так, средневзвешенная цена закупки препаратов производных сульфонилмочевины для аптек составила 312,02, а для ЛПУ 334,4 рубля, препараты инсулина и его аналогов стоили для аптек 1 220,12 и 1 253,07 рубля для государственных учреждений, закупка метформина для государственных учреждений обошлась дешевле, чем для коммерческих (186,03 против 182,39 рублей).

Таким образом, совокупный объем рынка гипогликемических средств за 2016 год составил 31 327 911 (общий объем фармацевтического рынка за 2016 год 5,1 млрд упаковок) в натуральных и 11 432 760 898 (общий объем фармацевтического рынка за 2016 год 1 344 млрд рублей) денежных единицах. Большую часть рынка гипогликемических средств занимает коммерческий сектор. Среди лидирующих препаратов в первую очередь необходимо отметить относящиеся к ценовому сегменту до 500 рублей за упаковку. Именно средства, стоящие меньше этой суммы, составляют основу фармацевтического рынка СД, к ним относятся препараты производных сульфонилмочевины и метформин. Инсулин и его аналоги занимают значительное место, как в государственном, так и в коммерческом сегменте рынка, что свидетельствует о значительной нехватке льготного обеспечения этими препаратами. Исходя из представленных данных, можно сделать вывод о востребованности новых лекарственных средств и необходимости их внедрения на фармацевтический рынок РФ, при этом цена реализации не должна превышать 500 рублей. Также анализ рынка показал, что комбинации гипогликемических средств с метформином являются вполне перспективным направлением в повышении коммерческой эффективности препаратов.

1.6. Новые направления в разработке гипогликемических препаратов

1.6.1 Препараты инсулина

Инсулины являются наиболее эффективными ЛС, снижающим уровень глюкозы в крови. Основным недостатком этой группы гипогликемических лекарственных средств остаются их фармакокинетические характеристики и инъекционная форма выпуска, поэтому проводятся разработки новых путей введения и улучшения их фармакокинетики.

Основные направления в разработке современных аналогов инсулина заключаются в попытке дальнейшего сокращения числа инъекций, как например препарат Insumera (PhaseBio) или LY2605541 (Lilly) с режимом дозирования 1 раз в сутки или аналоги инсулина для введения 1 раз в неделю (Hanmi и NovoNordisk (HM12460A и LAI287 / NN1436)).

Другим перспективным направлением в усовершенствовании инсулинотерапии является разработка альтернативных инъекционным лекарственным форм инсулина и его аналогов.

Пероральный инсулин, подобно эндогенному, будет проходить в большей степени через печень, снижая синтез глюкозы и гликогенолиз. В настоящее время несколько оральных инсулинов находятся в разработке: на I фазе клинических исследований – OI287GT (NN1956) (NovoNordisk), на II фазе – инсулины короткого действия ORMD-0801 (Oramed) и Capsulin (Diabetology), на III фазе – IN-105 (Biocon).

Перспективной представляется разработка ингаляционных форм инсулина. Exubera (Pfizer) была передана другой компании (Dance Pharmaceuticals) для доставки в ином устройстве (DANCE-501): II фаза испытаний с этим препаратом была завершена, и компания планирует завершающую III фазу испытания. Afrezza® (Mannkind) – в июне 2014 года

FDA одобрило этот препарат для применения при СД в качестве инсулина ультракороткого действия с режимом введения перед едой.

1.6.2 Ингибиторы 11- β -гидроксистероиддегидрогеназы 1-го типа (11b-HSD1)

11- β -гидроксистероиддегидрогеназа 1-го типа – фермент, экспрессия которого отмечается в печени, жировой ткани и ЦНС. Этот фермент катализирует превращение физиологически неактивного кортизона в активный гормон кортизол. Предполагается, что в основе сложного патогенеза метаболического синдрома и СД2 играют определенную роль изменения синтеза и метаболизма глюкокортикоидов. Животные с выключенным геном 11b-HSD1 имеют нормальный метаболический фенотип и проявляют устойчивость к гипергликемии вызванной стрессом, а также устойчивость к развитию индуцируемого высококалорийной диетой ожирения и метаболического синдрома. Напротив, повышенная экспрессия 11b-HSD1 в жировой ткани нарушала толерантность к глюкозе и приводила к развитию ожирению. Еще большая экспрессия 11b-HSD1 в печени приводила к гипертензии и дислипидемии в дополнение к инсулиновой резистентности [Anderson A., 2013].

Проведение экспериментальных исследований показало наличие значимого терапевтического эффекта после недельного введения ингибитора 11b-HSD1 [Barf T., 2002; Véniant M. M., 2010].

За время поиска ингибиторов данного фермента было подано свыше 250 патентных заявок от более чем 25 фармацевтических компаний и академических групп. Три ингибитора 11b-HSD1 находятся на I и три на II фазе клинических исследований.

1.6.3 Ингибиторы протеинтирозинфосфатазы 1В (PTP1B)

Физиологическая регуляция действия инсулина и лептина контролируется фосфорилированием и дефосфорилированием инсулинового и лептинового рецепторов. Внутриклеточный фермент протеинтирозинфосфатаза 1В (PTP1B) является негативным регулятором инсулинового и лептинового сигнального каскада по принципу отрицательной обратной связи и рассматривается в качестве перспективной терапевтической мишени при лечении ожирения и СД2 [Спасов А.А., 2013; Yang R., 2007].

В настоящее время лишь несколько ингибиторов PTP1B находятся на клинических испытаниях – ISIS 113715 (Isis Pharmaceuticals), Trodusquemine (MSI-1436, Ohr Pharmaceutical Inc), TTP814 (TransTech Pharma Inc). Соединение ISIS 113715 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, комплементарный мРНК фермента PTP1B, способный снизить трансляцию данного белка. Монотерапия соединением ISIS 113715 обеспечивало контроль уровня глюкозы, снижение ЛПНП, не вызывая состояния гипогликемии у пациентов с недавно диагностированным СД2.

Соединение MSI-1436 (обратимый, неконкурентный и высокоселективный ингибитор фермента PTP1B) оказывало периферическое (нормализация содержания глюкозы, повышение окисления жирных кислот), а также центральное действие (снижение аппетита) [Cho H., 2013]. Результаты исследований TTP814 (TransTech Pharma Inc) в настоящее время не опубликованы.

1.6.4 Ингибиторы стеарил-КоА десатуразы 1 (SCD1)

Стеарил-КоА десатураза 1 (SCD1) – один из основных ферментов биосинтеза высших ненасыщенных жирных кислот. Ингибирование SCD1 приводит к увеличению времени окисления глюкозы в митохондриях, что в

свою очередь, способствует контролю гипергликемии у больных с СД [Voss M. D., 2013].

В попытке создать селективный ингибитор фермента SCD1 было разработано 2 поколения соединений. Первое поколение было представлено высокоселективными ингибиторами, не имеющими тканевой специфичности. При экспериментальном изучении, наряду с их положительным влиянием на массу тела, уровень глюкозы, инсулина и триглицеридов в плазме, у животных наблюдались множественные побочные эффекты, отмеченные до этого у нокаутов [Ramtohul Y.K., 2010]. Ингибиторы SCD1 второго поколения отличались способностью связываться с органическими анион транспортирующими белками печени, что приводило к накоплению там препарата при минимальной его концентрации в плазме. Таким образом, соединения сохраняли свой эффект подавления синтеза ТГ в печени и были лишены побочных эффектов своих предшественников, которые, однако, начинали проявляться при увеличении терапевтической дозы более чем в 3 раза [Oballa R. M., 2011].

1.6.5 Антагонисты рецептора к интерлейкину-1 β (ИЛ-1 β)

При СД2 наблюдается снижение функции и массы β -клеток островков Лангерганса. Как показали данные экспериментальных исследований, антагонист рецептора к ИЛ-1 β предотвращал наступление диабета у мышей, получающих диету с высоким содержанием жиров и сахарозы в течение 12 недель.

Препарат canakinumab/Ilaris[®] (Novartis), представляющий собой ингибитор ИЛ-1 β и уже одобренный FDA для лечения криопирин-ассоциированного периодического синдрома, активного системного ювенильного идиопатического артрита и трех аутовоспалительных заболеваний, в настоящее время находится на II–III фазе клинических исследований для лечения СД2 [Chalkiadaki A., 2012; Maiorino M.I., 2016].

Gevokizumab представляет собой рекомбинантное моноклональное антитело человека, которое связывает и нейтрализует ИЛ-1 β человека. В плацебо-контролируемом исследовании [Moynihan K.A., 2005; Maiorino M.I., 2016] с участием 98 пациентов на фоне приема Gevokizumab отмечено снижение HbA1c на 0,85% через 3 месяца, наряду с усилением секреции С-пептида, повышением чувствительности к инсулину и снижением уровней СРБ.

LY2189102 (Lilly) представляет собой гуманизированное моноклональное антитело (IgG4), которое связывается с ИЛ-1 β с высокой аффинностью и нейтрализует его активность. В фазе II клинических испытаний подкожное еженедельное введение LY2189102 в течение 12 недель пациентам с СД2 приводило к снижению уровня HbA1c и воспалительных биомаркеров, включая СРБ и ИЛ-6.

AC-201 (TWi Biotechnology) единственный доступный для перорального применения двухдневный маломолекулярный препарат, который ингибирует продукцию и активность ИЛ-1 β и интерлейкинового рецептора 1 типа. В исследовании II фазы после 24 недель лечения данным препаратом показано снижение уровня HbA1c до 0,49% по сравнению с плацебо.

Другой подобный препарат от XBiotech, названный T2-18C3/Xilonix, предназначен для подкожного введения 2–3 раза в неделю. Препарат представляет собой моноклональные антитела человека, нейтрализующие ИЛ-1 α , потенциальным преимуществом которых выступает меньшая иммуногенность по сравнению с другими сконструированными гуманизированными антителами. Промежуточный анализ II фазы клинических испытаний показал, что T2-18C3 улучшает гомеостаз глюкозы и функцию β -клеток.

1.6.6 Второе поколение ингибиторов фруктозо-1,6-бисфосфатазы

Эндогенная продукция глюкозы, в частности глюконеогенез в печени, вносит большой вклад в развитие гипергликемии у больных СД2. Из сахароснижающих средств только метформин косвенно подавляет глюконеогенез. Фруктозо-1,6-бисфосфатаза является ключевым ферментом глюконеогенеза, ингибирование которого теоретически не влечет за собой фатальных последствий, что подтверждается наличием нормального фенотипа у субъектов с дефицитом фруктозо-1,6-бисфосфатазы при соблюдении диеты и избегании длительного голодания [Erion M. D., 2005]. Соединение MB07803 в настоящее время находится на II фазе клинических испытаний. Его применение оказывает значимое нормогликемическое действие без риска развития гипогликемии. Препарат отличается широким терапевтическим интервалом и низкой вероятностью развития лактатацидоза, обладает оптимальным для ежедневного применения периодом полураспада [Poelje P.D., 2011].

1.6.7 Ингибиторы гликогенфосфорилазы

Печеночная гликогенфосфорилаза регулирует высвобождение глюкозы из хранилища в печени [Freeman S., 2006] и в наибольшей степени участвует в гомеостаз глюкозы в организме, являясь объектом для терапевтического воздействия при СД2.

Хотя к поискам ингибиторов гликогенфосфорилазы подключилось множество крупных компаний, результаты клинических исследований в открытой печати представлены скупо. Было заявлено о хорошей переносимости и дозозависимой супрессии повышения выработки глюкозы печенью в ответ на нагрузку глюкагоном по сравнению с плацебо. Результаты клинических испытания дали бы возможность ответить на вопросы, связанные с безопасностью данного класса гипогликемических

соединений. Относительно риска развития гипогликемии указано, что при отсутствии случаев гипогликемии у животных и у людей ингибиторы гликогенфосфорилазы при голодании способны вызвать мягкое гипогликемическое состояние. Также остается проблемой селективное ингибирование печеночной изоформы фермента, которая имеет близкое строение с мышечной изоформой. При этом, даже при заявленной селективности соединения, второй серьезной проблемой ингибиторов гликогенфосфорилазы являются мышечная слабость и повышенная утомляемость, что у лиц с СД и ожирением ограничивает переносимость физических нагрузок, которые им крайне необходимы [Dang Q., 2011]. Кроме того, на фоне применения данной группы препаратов возможны патоморфологические изменения в печени вследствие накопления в ней гликогена. Такой факт был установлен при длительном введении животным с СД [Floettmann E., 2010], однако подобных данных при проведении клинических исследованиях не выявлено.

Ингибиторы гликогенфосфорилазы продолжают быть привлекательной мишенью для фармакотерапии СД₂, но остается много неясного относительно эффективности и безопасности препаратов данной группы при длительном применении.

1.6.8 Активаторы сиртуинов

Сиртуин 1 (SIRT1) важен как ключевой метаболический сенсор в тканях с интенсивным метаболизмом и функционирует посредством регуляции экспрессии ряда генов. SIRT1 контролирует метаболизм глюкозы и липидов в печени, повышает утилизацию жиров и стимулирует ремоделирование бурого жира в белый, контролирует секрецию инсулина в поджелудочной железе, влияет на гипоталамус, участвуя в формировании чувства насыщения, изменяет активность макрофагов при воспалении, вызванном ожирением. SIRT1 является ключевым модулятором

глюконеогенеза при голодании, при котором наблюдается повышение SIRT1-опосредованного деацилирования и активации PGC-1 α (транскрипционный коактиватор рецептора PPAR γ), важнейшего кофактора множества факторов транскрипции, что приводит к повышению окисления жирных кислот и улучшению гомеостаза глюкозы [Vetterli L., 2011; Purushotham A., 2009; Chalkiadaki A., 2012]. Ресвератрол (аллостерический активатор SIRT1) при введении мышам, содержащимся на высококалорийной диете, снижал их массу тела и практически полностью устранял метаболические нарушения, повышал секреторную активность β -клеток [Vetterli L., 2011].

При повышении экспрессии SIRT1 посредством подавления транскрипции фермента UCP2 (разобщающий белок 2, препятствующий выработке инсулина клетками поджелудочной железы) в β -клетках снижается толерантность к глюкозе и повышается секреция инсулина [Moynihan K. A., 2005]. Механизм устранения инсулинорезистентности, очевидно, реализуется посредством активации генов, отвечающих за окисление жирных кислот в митохондриях через PGC-1 α , в скелетных мышцах, в том числе и за счет взаимодействия с АМФ-активируемой протеинкиназой (AMP activated protein kinase, AMPK, АМФК), другим существенным метаболическим сенсором.

1.6.9 Ингибиторы ацил-СоА: диацилглицерол-ацилтрансферазы 1 (DGAT-1)

Биосинтез и накопление триглицеридов в тканях контролируется преимущественно в двух биохимических путях. Оба пути приводят к синтезу диацилглицеридов, которые превращаются в триглицериды, через реакцию ацилирования третьей молекулой ацил-КоА. Данная реакция катализируется в большей части ферментом диацилглицерол-ацилтрансферазой. Таким образом, ферменты, вовлеченные в пути синтеза ТГ, привлекают к себе

внимание в качестве терапевтической мишени [Chen H.C., 2006; Smith S.J., 2000].

Различают диацилглицерол-ацилтрансферазы 1 (DGAT-1) и диацилглицерол-ацилтрансферазы 2 (DGAT-2). В большей мере экспрессия данных ферментов происходит в тканях органов, ответственных за производство большого количества ТГ, таких как тонкий кишечник, жировая ткань, печень и молочная железа [Smith S. J., 2000; Villanueva C. J., 2009]. При экспериментальных исследованиях ингибиторы фермента DGAT-1 проявляли способность статистически значимо снижать массу тела животных (на 8,5–50% на разных моделях), уровень триглицеридов в печени животных (на 25%) [Zhang X. D., 2010] и количество потребляемой пищи на 17–27% [Smith S. J., 2000].

В настоящее время клинические испытания проходят 3 ингибитора фермента DGAT-1, один из которых находится на 2 фазе испытаний. Пока результаты клинических испытаний не отражены в открытой печати. При этом только они могут пролить свет на реальную пользу ингибирования фермента DGAT-1 при ожирении и СД2.

Открывающиеся перспективы поиска и создания новых лекарственных средств могут способствовать разработке дополнительных стратегий терапии СД2, ожирения и метаболического синдрома. Помимо отмеченных относительно новых мишеней для создания лекарственных средств, нормализующих углеводный и липидный обмен, в настоящее время продолжается поиск среди активаторов глюкокиназы («сенсора» глюкозы), активаторов аденозинмонофосфат-активируемой протеинкиназы (АМРК-клеточная протеинкиназа), антагонистов к глюкагоновому рецептору [Pfefferkorn J. A., 2013; Coughlan K. A., 2014; Christensen M., 2011] и др.

1.7 Новые направления в разработке гипогликемических препаратов, влияющих на систему инкретинов

Инкретины – группа гормонов, секретируемых преимущественно клетками кишечника, контролирующие метаболизм углеводов, путем повышения глюкозозависимой секреции инсулина β -клетками, угнетения выработки α -клетками поджелудочной железы глюкагона, снижения моторной активности желудка, регуляции пищевого поведения и других эффектов.

Первые работы, посвященные изучению инкретинов, были начаты в 1902 году, когда британские ученые У. Бейлисс и Э. Старлинг обнаружили, что кишечная слизь содержит гормон, стимулирующий экзокринную секрецию поджелудочной железы, и назвали его «секретин». В 1906 г. Moore с соавторами предположили наличие в экстракте двенадцатиперстной кишки гормона с гипогликемическим эффектом, а La Barre в 1932 г. дал ему название «инкретин». В 1964 г. Elrick с соавторами открыли «инкретиновый эффект», показав большую секрецию 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].

Из ряда кишечных гормонов с инкретиноподобным действием выделяют 2 основных: глюкагон-подобный пептид-1 (ГПП-1) и глюкозозависимый инсулиотропный пептид (ГИП). ГПП-1 секретируется в двух эквивалентных по активности формах: ГПП-1(7-37) и ГПП-1(7-36)амид, который больше секретируется после еды [Власов Т. Д., 2016] (табл.3). Основная часть ГПП-1 производится L-клетками тощей и подвздошной кишки, а ГИП – K-клетками двенадцатиперстной и тощей кишки. Плазменный уровень ГПП-1 натощак 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) [Власов Т. Д., 2016].

Таблица 3

Эффекты основных инкретинов и их метаболитов

ГПП-1		ГИП	
Нативная форма	Метаболит	Нативная форма	Метаболит
ГПП-1(7-36)амид	ГПП-1(9-36)амид	ГИП-(1-42)	ГИП-(3-42)
↑Секреция инсулина; ↓Постприанальная секреция глюкагона; ↓Скорость опустошения желудка; ↑Скорость насыщения; ↓Потребление пищи; ↑Пролиферация β -клеток; ↑Эндотелий-зависимая и -независимая вазодилатация [Аметов А. С., 2014а]; Цитопротективный эффект в отношении β -клеток, кардиомиоцитов, эндотелиоцитов и нейронов [Campbell J.E., 2013; Candeias E. M., 2015].	По результатам некоторых исследований обладает рядом эффектов: Инсулин-независимое снижение глюкозы; Кардиопротективный эффект; Вазоактивные свойства; Эндотелиопротективный эффект при И/Р миокарда [Аметов А.С., 2014а; McClean P. L., 2015].	↑Секреция инсулина; ↑Секреция глюкагона; ↑Выживаемость β -клеток; ↑Липолиз; Ингибирование секреции HCl; Ингибирование моторики ЖКТ [Sabou C., 2011; Симаненкова А. В., 2014].	Антагонист рецептора к ГИП (в больших дозах) [Симаненкова А.В., 2014].

Примечания. «↑» – повышение; «↓» – снижение; И/Р – ишемически-реперфузионное повреждение; HCl – соляная кислота; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт.

Инкретины регулируют метаболизм углеводов путем повышения глюкозозависимой секреции инсулина β -клетками, снижения секреции глюкагона, моторной активности желудка, аппетита и других эффектов [Athauda D., 2016]. Показано, что эти гормоны секретируются в течение нескольких минут после приема пищи, достигая концентрации в плазме приблизительно до 50 пмоль/л, которая возвращается к исходному уровню в течение 3 часов (период активного действия в организме для ГПП-1 составляет 1–2 мин, для ГИП 5–7 мин).

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 уровня гликемии, который является независимым фактором риска в развитии сердечно-сосудистых заболеваний у больных сахарным диабетом 2 типа [Какорин С.В., 2016; Мкртумян А.М., 2008б]. Однако накопленные за последние 10 лет экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о ряде плеiotропных эффектов, присущих инкретиномиметикам, которые расширяют их терапевтический потенциал. Основой для этого является широкое распространение рецепторов ГПП-1 (ГПП-1R) в органах и тканях. В норме ГПП-1R идентифицируется в поджелудочной железе, кишечнике, легких, жировой ткани, мышцах, почках, сердце, эндотелиальных, гладкомышечных клетках сосудов (ГМК), макрофагах и моноцитах, а также в нейронах и глиальных клетках [Судаков Н.П., 2006; Guardia-Laguarta С., 2014; Chen Y., 2015]. При этом не исключается и ГПП-1R-независимые эффекты ГПП-1, в частности, способность к активации калиевых АТФ-каналов и β_2 -адренорецепторов [Zhan Y., 2012].

1.7.1 Новые ингибиторы ДПП-4

В 2006 году FDA был одобрен к применению первый ингибитор ДПП-4 – ситаглиптин. После этого разработки ЛС данной группы были продолжены, и в настоящее время существует 17 препаратов данной группы.

Одним из направлений повышения эффективности лечения пациентов с СД2 является попытка разработки иДПП-4 пролонгированного действия. В настоящее время два препарата – омариглиптин (Merck-ML-3102) и трелагриптин (Takeda-SYR-472) находятся на III стадии клинических

исследований и принимаются перорально 1 раз в неделю. Краткая характеристика иДПП-4 и их химические структуры представлены в приложении 1.

1.7.2 Глюкагоноподобные пептидные агонисты

Агонисты глюкагоноподобного пептида-1 являются одними из наиболее эффективных препаратов для лечения СД2. Однако все доступные в настоящее время аГПП-1 имеют инъекционные формы, что является барьером для их использования многими пациентами. Поэтому ведутся разработки по созданию альтернативных лекарственных форм данной группы препаратов.

В настоящее время созданы несколько агонистов ГПП-1 для перорального применения: ORMD-0901 (пероральный эксенатид Орамеда); NN9924, NN9926, NN9927 и NN9928 (NovoNordisk); Nodexen (пероральный эксенатид NOD Pharmaceuticals); TTP054 (Transtech) и ZYOG1 (Zydus). NN9924, ORMD-0901 и TTP054 уже достигли этапа II фазы клинических исследований. Если эти соединения будут хорошо переноситься и иметь сравнимую с инъекционными аГПП-1 эффективность, они могут занять важное место в лечении СД2.

Фармацевтической компанией MannKind Corp разрабатывается ингаляционная форма аГПП-1 соединение MKC253. Предполагается, что при вдыхании оно через легкие попадает в артериальное русло, циркулируя в котором достигает клеток-мишеней до деградации. Исследование у пациентов с СД2 показало, что применение соединения MKC253 значительно снижало показатели глюкозы после приема пищи, увеличивая секрецию инсулина [Marino M.T., 2010].

Другим новаторским подходом является разработка способов непрерывного введения эксенатида с помощью подкожного устройства DUROS® [Rohloff C.M., 2008]. Применение этого метода будет способствовать соблюдению пациентом режима приема гипогликемического

средства. В настоящее время эффективность метода оценивается в III фазе КИ.

1.8 Плейотропные эффекты инкретиномиметиков

Агонисты ГПП-1 рецептора и иДПП-4 привлекают внимание ученых и производителей лекарственных средств, поскольку обладают выраженной гипогликемической активностью, безопасны в отношении риска развития гипогликемии и благодаря наличию широкого круга плейотропных эффектов (Рисунок 2).

1.8.1 Кардиопротективное действие

В исследованиях *in vitro* установлено, что кардиопротективный эффект опосредован способностью ГПП-1 подавлять PDGF-индуцированную пролиферацию клеток гладких мышц сосудов, влиять на экстрацеллюлярные сигнал-регулируемые киназы (ERK1/2) и фосфоинозитоло-3-киназы (PI3K) [Ban K., 2010]. Применение ГПП-1 сохраняет жизнеспособность кардио- и эндотелиоцитов, снижает площадь инфаркта, а также улучшает функцию левого желудочка [Liu L., 2015]. Кардиопротективное действие аГПП-1 может реализовываться за счет увеличения поглощения глюкозы миокардом [Amber C.F., 2014; Xiao-Yun X., 2011; Aravindhan K., 2015; Zhao T., 2006], снижения генерации активных форм кислорода (ROS). Данные экспериментальных исследований были подтверждены в клинических условиях [Fadini G. P., 2011; Ravassa S., 2012] Рандомизированное контролируемое исследование, выполненное с участием 172 пациентов, с инфарктом миокарда с подъемом ST-сегмента также показало, что у пациентов, которые получали терапию эксенатидом, размер инфаркта был достоверно меньше [Lønborg J., 2012].

1.8.2 Влияние на артериальное давление

Мета-анализ 6 клинических исследований эксенатида при СД2 (общее количество участников 2171, длительность наблюдения от 6 месяцев), показал снижение АД на фоне его применения [Lorber D., 2013; Tate M., 2015]. Близкие результаты получены в исследовании LEAD, в котором лираглутид снижал САД у испытуемых на 2,1–6,7 мм рт. ст. Для ингибиторов ДПП-4 в клинических исследованиях отмечено незначительное влияние на артериальное давление (снижение АД на 2–4 мм рт. ст.) [Amber C. F., 2014].

В исследованиях на животных введение лираглутида стимулирует секрецию предсердного натрийуретического пептида (ANP) *in vivo* и *in vitro* на изолированном сердце. Это позволяет предполагать, что снижение АД хотя бы частично опосредовано через ANP. Длительное введение ГПП-1 предупреждает развитие артериальной гипертензии как в эксперименте, так и в клинике [Tate M., 2015; Kim M., 2013].

1.8.3 Функциональное состояние эндотелия

Ряд экспериментальных и предварительных клинических исследований свидетельствуют о том, что метаболит ГПП-1 оказывает влияние на эндотелиальную систему [Anagnostis P., 2011]. Например, *in vitro* показано, что агонист ГПП-1 (эксендин-4) стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток коронарной артерии через активацию eNOS, протеинкиназы A (PKA) и фосфоинозитоло-3-киназы (PI3K/Akt) [Aronis K.N., 2013]. Эндотелиотропные эффекты ГПП-1 опосредуются в том числе и за счет увеличения биодоступности оксида азота, через ГПП-1 рецептор-зависимые и независимые пути [Ban K., 2010], а также за счет увеличения пролиферации васкулопротекторных эндотелиальных клеток-предшественников (EPCs) [Xiao-Yun X., 2011]. Вазодилатирующий эффект ГПП-1 снижается при блокаде NOS или удалении эндотелия [Eriksson L., 2015]. Клинические

исследования подтверждают способность ГПП-1 защищать от индуцированной высоким уровнем глюкозы эндотелиальной дисфункции, улучшать сосудистый ответ на введение ацетилхолина и нитропруссид натрия [Tate M., 2015; Oyama J., 2014]. Эндотелиопротективный механизм действия ГПП-1 опосредован, в том числе, открытием АТФ-зависимых K^+ -каналов митохондрий [Ha S.J., 2012; O'Rourke B., 2004]. Активация ГПП-1 рецептора способна индуцировать механизмы прекондиционирования [Ha S.J., 2012; Basu A., 2007].

ДПП-4 экспрессируется на эндотелиальных клетках, особенно в микрососудистом русле. Важно отметить, что *in vitro* в микрососудах активность и экспрессия ДПП-4 повышается при высокой концентрации глюкозы. Фармакологическое или генетическое ингибирование ДПП-4 увеличивает рост эндотелиальных клеток. В культивируемых эндотелиальных клетках алоглиптин увеличивал активацию пути Akt-eNOS и индуцировал выделение NO [Fadini G.P., 2011; Amber C.F., 2014].

1.8.4 Антитромботическое и антиагрегантное действие инкретиномиметиков

В ряде экспериментальных исследований была показана способность агонистов ГПП-1Р замедлять рост тромба и снижать агрегацию тромбоцитов. При добавлении эксенатида в культуру мегакариоцитов человека, в клетках наблюдалось увеличение цАМФ, а также замедление агрегации тромбоцитов при добавлении к ним индукторов агрегации. В условиях *in vivo* внутривенная инъекция эксенатида приводила к замедлению тромбообразования на модели артериального тромбоза, что не подтвердилось в исследованиях на нокаутных по (eNOS-/-) животных. Реализация антиагрегантного эффекта агониста ГПП-1Р по всей видимости осуществляется по пути ГПП-1Р/РКА/eNOS/NO/ГЦ/цГМФ [Cameron-Vendrig A., 2016; Jia G., 2016].

1.8.5 Воспаление в сосудистой стенке

Агонисты ГПП-1Р и ингибиторы ДПП-4, посредством активации ГПП-1Р, дозозависимо активируют стресс-чувствительный фермент AMPK в эндотелиоцитах, который помимо стимуляции синтетической функции eNOS, также ингибирует активацию транскрипционного фактора NF-κB и соответственно VCAM-1, ICAM-1 и E-селектина [Amber C.F., 2014; Xiao-Yun X., 2011; Krasner H.M., 2014]. Под действием ГПП-1 происходит снижение стимулированной ФНО-α продукции активных форм кислорода, а экспрессия антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы-1 и -2, наоборот, возрастала [Oyama J., 2014].

ГПП-1 и эксендин-4 ингибировали хемокин-индуцированную миграцию CD4+, а также способствовали приобретению тканевыми макрофагами противовоспалительного (M2) фенотипа, что снижает воспаление и замедляет формирование атеросклеротической бляшки в стенке сосуда. Применение инкретиномиметиков вызывает супрессию NF-κB сигнального пути, снижение экспрессии провоспалительных цитокинов (ФНО-α, ИЛ-6), некоторых рецепторов (toll-like рецептор-2 и 4), активности матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9), а также экспрессии эндотелиоцитами белка MCP-1 [Arakawa M., 2010; He L., 2013; Hogan A. E., 2014].

В клинических исследованиях показано, что у пациентов, получавших лираглутид, наблюдалось снижение C_{РБ} (на 12–20%), ингибитора активатора плазминогена PAI-1 (на 25–29%) [Lorber D., 2013; Anagnostis P., 2011] и натрийуретического пептида В (на 30–38%). В другом исследовании применение лираглутида снижало содержание PAI-1, E-селектина и асимметричного диметиларгинина (ADMA) [Tate M., 2015; Oyama J., 2014].

1.8.6 Апоптоз и пролиферация эндотелиальных клеток

Внесение ГПП-1 в среду, где эндотелиоциты инкубировались с КПП, приводило к снижению апоптоза. Было выяснено, что ГПП-1 ингибирует КПП-стимулированный апоптоз, ингибируя экспрессию Bax и повышая соотношение Bcl-2/Bax [Zhan Y., 2012].

Агонисты ГПП-1 и ингибиторы ДПП-4 *in vitro* стимулируют пролиферацию и дифференциацию эндотелиальных клеток-предшественников, а также секрецию ими фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) [Lorber D., 2013; Oyama J., 2014; Xiao-Yun X., 2011; Wei R., 2016; Avogaro A., 2014; Wang X. M., 2013].

1.8.7 Проллиферация гладкомышечных клеток

Причиной повышенной пролиферации ГМК является фактор роста тромбоцитов (PDGF), продуцируемый эндотелиоцитами и макрофагами в условиях гипергликемии, а также вследствие снижения выделения NO. В условиях *in vitro* эксендин-4 снижал пролиферацию ГМК, стимулированную фактором роста тромбоцитов, а на модели сосудистого повреждения в условиях инсулинорезистентности *in vivo* снижал гиперплазию интимы [Goto H., 2011]. В серии экспериментов *in vitro* на фоне превентивного добавление эксендина-4 в культуру ГМК замедлялась стимулированная ангиотензином II пролиферация и миграция гладкомышечных клеток. Авторы ассоциировали это со способностью эксендина-4 снижать активность ERK1/2 и JNK [Nagayama K., 2015] в гладкомышечных клетках, со снижением активности Ras1 через цАМФ/РКА сигнальный путь [Zhao L., 2014]. Ингибитор ДПП-4 дозозависимо замедлял пролиферацию ГМК, что сопровождалось снижением количества фосфорилированной формы белка pRb, регулирующего переход из G1 в S фазу цикла клеточного деления [Choi S. H., 2015]. Ингибирование пролиферации ГМК сопряжено со способностью

инкретиномиметиков повышать степень фосфорилирования eNOS и продукцию NO [Krasner H. M., 2014; Eriksson L., 2015].

1.8.8 Влияние на липидный обмен

Продолжительное введение пациентам с СД2 эксенатида приводило к снижению плазменного уровня ТГ в среднем на 12%, ЛПНП на 6%, при этом уровень ЛПВП изменялся незначимо. В исследованиях LEAD-2 и LEAD-3 лираглутид значимо снижал жировую массу у пациентов с СД2 при монотерапии и в комбинации с метформином [Jendle J., 2009]. В доклинических исследованиях отмечается снижение постпрандиального уровня ТГ при применении ситаглиптина. Точный механизм влияния агонистов ГПП-1Р и ингибиторов ДПП-4 на липидный профиль остается нераскрытым [Lorber D., 2013; Anagnostis P., 2011; Tate M., 2015], но можно предположить, что это связано с замедлением всасывания питательных веществ и снижением количества потребляемой пищи.

1.8.9 Нейропротекторные свойства инкретинов

ГПП-1 секретируется в головном мозге в дорсальном комплексе блуждающего нерва клетками ядра солитарного тракта и в малой группе нейронов, сосредоточенных в области А1 ретикулярной формации в продолговатом мозге [Cabou C., 2011; Athauda D., 2016]. В гипоталамусе рецептор в основном представлен дугообразном ядре (сопряженным с регуляцией аппетита), паравентрикулярном ядре (выделяет окситоцин, который подавляет аппетит, поступая в вентромедиальное ядро; соматостатин – замедляет моторику желудка), дорсомедиальном ядре (регуляция АД и ЧСС) и супрахиазматическом ядре (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) [Cabou C., 2011]. В качестве нейропептида ГПП-1 может регулировать многие вегетативные и нейроэндокринные функции. В эксперименте и в клинике показано, что ГПП-1, подавляя активность n.vagus, снижает моторику желудка, секрецию желудочных желез и панкреатического сока [Herpner K.M., 2015], активность оси «головной мозг – кишечник». Он регулирует аппетит посредством (1) замедления опустошения желудка, связанного с угнетением блуждающего нерва, и (2) формирования чувства насыщения через взаимодействие с рецептором к ГПП-1 в ядрах гипоталамуса. Все это приводит к снижению аппетита, объема потребляемой пищи и массы тела [Cabou C., 2011; Campbell J. E., 2013].

1.8.10 Церебропротективные свойства инкретиномиметиков при нейродегенеративных заболеваниях и при ишемии головного мозга

Результаты многих экспериментальных исследований нейропротективного действия инкретиномиметиков показывают уменьшение размеров инфаркта ткани мозга и выраженности неврологического дефицита, а также ускорение восстановления пораженной ткани и когнитивных функций при лечебно-профилактическом введении аГПП-1 [Аметов А.С., 2013, 2014б; Симаненкова А. В., 2014; Gonçalves A., 2016; McClean P.L., 2015; Yang D., 2013].

По результатам исследования LEADER (2010–2015, включавшего 9340 пациентов с СД2) добавление лираглутида к стандартной терапии снижало количество сердечно-сосудистых осложнений на 12,4% (608 из 4668) в сравнении с группой получавшей стандартную терапию – 694 из 4672, а 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].

Клинические исследования ингибиторов ДПП-4 показывают, что их применение не влияет на риск возникновения сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с СД2 [Green J.B., 2015]. Дипептидилпептидаза-4 участвует в деградации многих физиологически активных веществ: мозгового натрийуретического пептида (BNP), фактора, происходящего из стромальных клеток-1 α (SDF-1 β), нейропептида Y (NPY), пептида YY (PYY) и др. [Мкртумян А.М., 2015а]. Изменение их концентраций может оказывать непредсказуемые эффекты в условиях острого или хронического ишемического процесса. Однако в научной литературе описаны исследования, показывающие наличие нейропротективного потенциала у последнего ингибитора ДПП-4 – линаглиптина при моделировании ишемии головного мозга [Ma M., 2015]. Возможно, это связано с его более высокой селективностью к ферменту или длительностью физиологического эффекта и наличием плеiotропных эффектов. Установлены возможные механизмы нейропротективного действия инкретиномиметиков, которые сходны с таковыми при лечении нейродегенеративных заболеваний: подавление апоптоза, снижение активации микроглии, повышение нейрональной пластичности [Власов Т.Д., 2016].

1.8.11 Нейровоспаление

Значительную роль в патогенезе повреждения ткани головного мозга отводят хроническому воспалению. При моделировании болезни паркинсона у крыс введение саксаглиптина приводило к подавлению экспрессии ФНО- α , iNOS и миелопероксидазы. Аналогично введение эксендина-4 животным с поражением черной субстанции предотвращало токсин-индуцированную активацию микроглии, а также подавление продукции провоспалительных цитокинов, в том числе ФНО- α и ИЛ-1 β [Athauda D., 2016]. В ряде экспериментальных работ (как на моделях болезней паркинсона и альцгеймера, так и при ишемически-реперфузионном повреждении нервной

ткани) была показана способность аналогов ГПП-1 влиять на активность микроглии. При этом применение инкретиномиметиков было сопряжено с ингибированием активации микроглии [McClean P.L., 2015; Cao L., 2016] с преобладанием противовоспалительного M2 фенотипа, а также снижением экспрессии генов провоспалительных цитокинов таких как ИЛ-1В, ФНО- α и MCP-1 [Gonçalves A., 2016; Shiraishi D., 2012].

Значимым механизмом снижения нейровоспаления инкретиномиметиками считается реализация внутриклеточного сигнального пути ГПП-1Р/PI3K/РКВ, одной из конечных мишеней которого является транскрипционный фактор NF- κ B [Оскола Е.В., 2013; Gonçalves A., 2016; Nassar N.N., 2015].

1.8.12 Функциональное состояние митохондрий и апоптоз

При нарушениях мозгового кровообращения нарушение в работе митохондрий является фатальным для клетки фактором [Судаков Н.П., 2006], значимость которого доказана и при нейродегенеративных заболеваниях [Guardia-Laguarta C., 2014]. Использование ингибиторов ДПП-4 и аналогов ГПП-1 оказывало протективное действие в отношении митохондрий, повышая активность комплекса I дыхательной цепи и противоапоптотического белка Bcl-2 с последующим снижением активности каспазы 3, что вело к сохранению дофаминергических нейронов при моделировании БП [Nassar N.N., 2015; Chen Y., 2015]. Механизм подобного эффекта связывают с активацией сигнальных путей ГПП-1Р/PI3K/РКВ (Akt) и ГПП-1Р/АЦ/РКА [Zhan Y., 2012]. Ряд исследований показывает, что инкретиномиметики могут влиять непосредственно на функционирование митохондрий. В условиях *in vitro* эксендин-4 повышал экспрессию митохондриального белка митофузина-2 [Morales P.E., 2014], что увеличивает структурно-функциональную связь эндоплазматического ретикулума с митохондриями [Орлова, Д.Д., 2015]. Введение эксендина-4 в

культуру панкреатических β -клеток вызывало двукратное увеличение экспрессии PGC-1 α – основного регулятора митохондриального биогенеза [Kang M.Y., 2015]. Некоторые исследователи предполагают, что аналоги ГПП-1 повышают активность PGC-1 α благодаря (показанной в условиях *in vitro*) способности повышать экспрессию сиртуина-1 [Zeng Y., 2016; Boutant M., 2013].

1.8.13 Нейрогенез

В экспериментах *in vitro* эксендин-4 стимулировал пролиферацию и нейрональную дифференциацию в культуре нейрональных клеток человека [Luciani P., 2010]. Лираглутид в условиях моделирования БА стимулировал нейрогенез в области зубчатой извилины гиппокампа [McClean P.L., 2015], а при моделировании БП эксендин-4 стимулировал нейрогенез в субвентрикулярной зоне [Bertilsson G., 2008], в обоих экспериментах отмечалось улучшение моторики конечностей. Также при экспериментальной ишемии головного мозга отмечено умеренное стимулирующее влияние аналогов ГПП-1 и ингибиторов ДПП-4 на нейрогенез [Darsalia V., 2014].

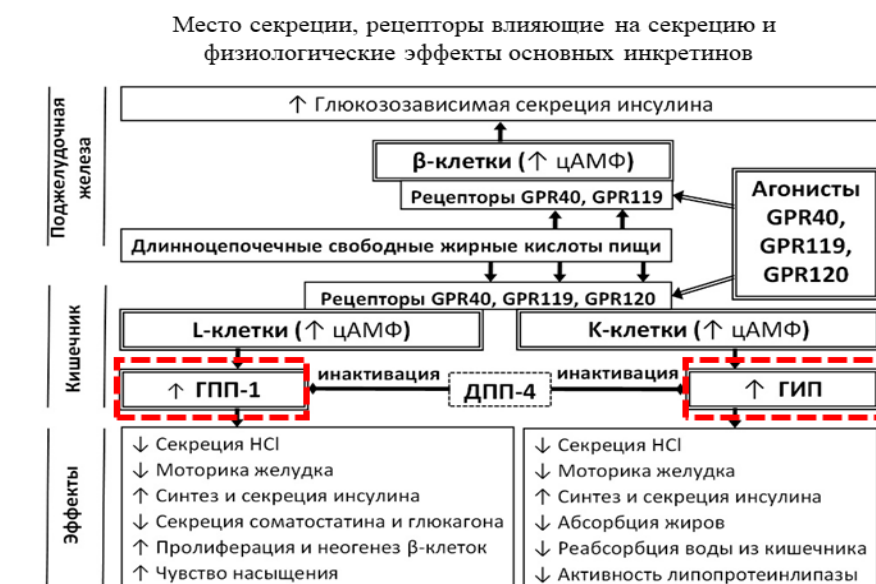
1.8.14 Нейротрофические факторы

При введении эксендина-4 и саксаглиптина повышается содержание нейротрофического фактора BDNF, известного своей способностью защищать дофаминергические нейроны, стимулировать дифференциацию клеток-предшественников участвовать в формировании пространственной памяти [Gumuslu E., 2016; Nassar N.N., 2015]. Профилактическое введение алоглиптина мышам значительно повышало уровень BDNF в коре и переднем мозге, 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-1P/PI3K/PKB(Akt) и ГПП-1P/АЦ/цАМФ, активирующих транскрипционный фактор CREB (cAMP response element-binding protein), который, в свою очередь, повышает экспрессию BDNF [Gumuslu E., 2016; Zhu H., 2016].

1.8.15 Патологическая агрегация белков, обучение и память

В исследованиях *in vivo* была показана способность аналогов ГПП-1 снижать накопление в клетках β -амилоида, снижать вызванную им гибель клеток посредством активации пути ГПП-1P/PI3K/PKB(Akt) с последующей инактивацией гликоген синтазы киназы 3- β (GSK-3B) – главного фермента, усиливающего фосфорилирование τ -белка и агрегацию α -амилоида [Medina M., 2014].



Влияние на стенку сосуда

Эндотелиальные клетки	Моноциты/Макрофаги	ГМК сосудистой стенки
↑ Вазодилатации; ↓ Воспаления; ↓ Экспрессии молекул адгезии; ↓ Апоптоза.	↓ Выделения провоспалительных цитокинов; ↓ Хемотаксиса; ↓ Формирования пенных клеток.	↓ Проплиферации ГМК в интима сосудов.

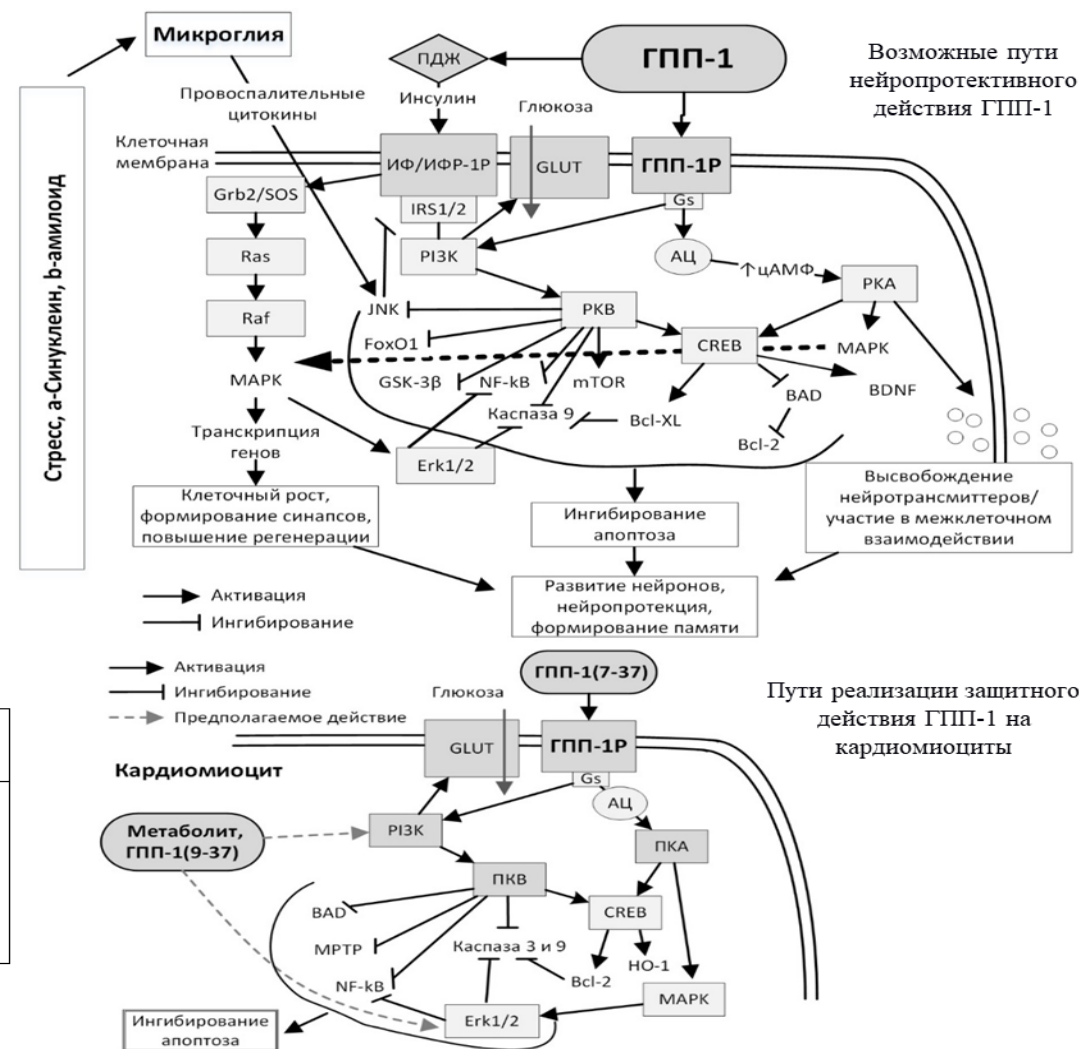


Рисунок 2. Плейотропные эффекты инкретинов и некоторые механизмы их развития

1.9 GPR119 как перспективная мишень для создания новых гипогликемических лекарственных средств

1.9.1 Рецептор GPR119

Более десятилетия назад исследователи обратили внимание на группу специфических рецепторов, локализованных, в основном, на β -клетках поджелудочной железы и энтероэндокринных клетках кишечника. Их активация связана с G-белком. Долгое время данные рецепторы были орфанными. В дальнейшем было установлено, что они способны активироваться жирными кислотами, их производными, а также некоторыми другими компонентами пищи, при их стимуляции наблюдалось повышение секреции инкретинов и инсулина, а поиск их агонистов стал перспективным подходом в создании регуляторов углеводного обмена [Fredriksson R., 2003].

Рецепторы, связанные с G-белком (GPCR), представляют собой одно из самых обширных семейств эукариотических трансмембранных белков. Данные рецепторы имеют общую структуру, состоящую из одного полипептида с внеклеточным N-концом, внутриклеточным C-терминалом и семью гидрофобными трансмембранными доменами (TM1-TM7), связанными с тремя вне- (ECL1-ECL3) и тремя внутриклеточными петлями (ICL1-ICL3). У человека выявлено около 800 рецепторов семейства GPCR1.

Эти рецепторы принято подразделять на основе гомологии их аминокислотной последовательности на: родопсин-подобные (класс A), семейство секретина (класс B), метаботропные глутаматные (класс C), феромоны спаривания грибов (класс D), цАМФ-зависимые рецепторы нитчатых грибов вида *Dictyostelium discoideum* (класс E) и являющиеся участниками сигналинга ряда специфических биохимических путей (класс F). Первый класс, в свою очередь, некоторыми авторами [Bakir B., 2006; Horn F., 2003] подразделяется на семейства родопсина, пептидов и аминов.

Альтернативная классификация GRAFS, названная так исходя из заглавных букв каждого семейства, делит рецепторы GPCR позвоночных на 5 семейств: глутаматов (Glutamate family), Родопсина (Rhodopsin family), «Сцепленное» семейство (Adhesion family), Frizzled («скрученное») и секретинов (Secretin family) [Alexander S., 2015; Isberg V., 2016].

Рецептор GPR119 был открыт Робертом Фредрикссоном с соавторами в 1999 году в рамках Проекта Геном Человека [Fredriksson R., 2003] и был классифицирован как принадлежащий к классу А (родопсин подобных), представляя собой 7 трансмембранных доменов из 335 аминокислот с суммарной молекулярной массой 36,889 кДа. Гомологи рецептора найдены у многих позвоночных животных, включая крыс, мышей, хомяков, приматов, собак и свиней [Fredriksson R., 2003; Takeda S., 2002.]. Рецептор GPR119 гомологически схож с аденозиновыми (A1, A2) и каннабиоидными [Costanzi S., 2008].

У человека GPR119 выявлен в поджелудочной железе – в клетках островков Лангерганса, кишечнике и печени новорожденных, у грызунов экспрессия представлена шире, в том числе в головном мозге [Chu Z.L., 2007; Overton H.A., 2006, 2008]. В ЖКТ иммунопозитивный в отношении GPR119 материал был обнаружен на ворсинках тонкого кишечника, где он локализован с глюкагон-подобным пептидом-1 в проглюкагон позитивных клетках. Этот рецептор был обнаружен в β -клеточных линиях NIT-1, MIN6, RIN5, HIT-T15 и линиях L-клеток: FRIC, mGLUTag, hNCI-H716 [Godlewski G., 2009]. Экспрессия GPR119 наблюдается и на α -клетках поджелудочной железы мыши и α -ТС-глюкагономы [Odori S., 2013].

При активации GPR119 повышается секреция инкретинов, которые дополнительно стимулируют выработку инсулина и обеспечивают состояние постпрандиальной нормогликемии. Кроме того, инкретины защищают β -клетки от апоптоза и увеличивают их пролиферацию [Gao J., 2011]. Такой двойной механизм действия предполагает, что активация GPR119 может улучшать гликемический контроль без риска гипогликемии. Исходя из этого,

агонисты GPR119 рассматриваются как перспективные кандидаты на роль лекарственных средств для лечения СД2 и метаболического синдрома.

1.9.2 Агонисты рецептора GPR119

В экспериментальных исследованиях и на здоровых добровольцах установлено, что агонисты GPR119 повышают концентрацию ГПП-1, ГИП и пептида тирозин-тирозин (PYY), снижают гипергликемию после приема пищи или при проведении перорального глюкозотолерантного теста. В экспериментальных исследованиях установлено кардио-, эндотелио- и церебропротективное действие, что, в отличие от многих существующих противодиабетических средств, которые обладают только гипогликемическим действием, может сделать их более эффективными в терапии СД и особенно для профилактики его осложнений [Saraiva F. K., 2014; Candeias E. M., 2015].

Агонисты рецептора GPR119 и создаваемые на их основе лекарственные средства могут оказаться эффективными для профилактики и лечения таких состояний, как нарушения углеводного и липидного обмена, ишемия головного мозга и миокарда [Cox H.M., 2010].

GPR119 может действовать паракринным и/или аутокринным образом, поскольку активируется множеством различных компонентов пищи, некоторыми производными поступающих в организм жиров и могут синтезироваться локально в ткани или просвете кишечника [Engelstoft M. S., 2014]. Аллостерические модуляторы являются более селективными, поскольку связываются с отличными от занимаемых эндогенными лигандами участками GPR119 [Zhang M., 2013]. Химические структуры, краткая характеристика и результат некоторых клинических исследований наиболее известных агонистов GPR119 приведены в Приложении 2 [Bakir B., 2006].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Экспериментальные животные

Работы выполнены на линейных крысах (Wistar) и нелинейных мышах обоих полов, которые содержались в стандартных условиях вивария с соблюдением всех правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований на территории РФ. Экспериментальные работы проводились в соответствии с Приказом Минздрава (Минздравсоцразвития) России о надлежащей лабораторной практике, ГОСТом Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики, Рекомендациям ВОЗ, «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985)». Все исследования были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер: ИРБ 00005839 IORG 0004900 (OHRP) 2 февраля 2014 г. (протокол № 191-2014).

Животные были получены из филиала «Столбовая» ГУ НЦБМТ РАМН (Московская обл.), ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово»» РАМН (Ленинградская область) и содержались с учетом правил Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). Освещение вивария было искусственным, температурный режим постоянным, в диапазоне от +20 до +24°C при влажности воздуха 45–65%.

После доставки из питомника животные осматривались ветеринарным врачом, а затем в течение 14 дней находились на карантинном режиме. По истечении карантина животных перемещали на постоянное содержание в виварий кафедры фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ.

2.2 Исследования *in vitro*[†]

Определение медианной эффективной концентрации, EC₅₀, M

Исследование специфической активности осуществляли с использованием линии клеток CHO-K1, в которых был стабильно экспрессирован человеческий рецептор GPR119 (hGPR119). Агонистическая активность соединений ряда ZB оценивалась по возрастанию внутриклеточной концентрации цАМФ, так как известно, что активация рецептора hGPR119 путем последующей активации клеточной аденилатциклазы ведет к повышению внутриклеточного содержания цАМФ. В качестве экспериментальной платформы была выбрана тест-система Lance Ultra cAMP (Perkin Elmer).

Определение растворимости

Кинетическую растворимость измеряли с помощью фильтровальной системы Millipore в универсальном буфере в присутствии 2% ДМСО при pH 2, 4 и 7. Контролями с высокой и низкой растворимостью были верапамил и диэтилстильбэстрол соответственно.

Определение микросомальной устойчивости и параметров ингибирования CYP450

Метаболизм соединений изучали в микросомальной фракции печени крыс и человека в присутствии ко-факторов изоферментов цитохрома P450, отвечающих за I фазу катаболизма ксенобиотиков. Убыль тестируемого вещества в процессе 30 минутной инкубации определяли с помощью ВЭЖХ-МС/МС анализа. Тест-препараты в концентрации 0,5 мкМ инкубировали с микросомальной фракцией печени на шейкере при 37°C в присутствии НАДФН. Реакции останавливали во временных точках (0, 5, 10, 15, 30 минут) путем добавления ацетонитрила. После осаждения белков, с помощью масс-спектрометрии определяли количество оставшегося в супернатантах тест-

[†] Исследование выполнено совместно с сотрудниками ЦВТ «ХИМРАР»

препарата. Инкубацию проводили в биологических повторностях, затем делали по 2 измерения для каждой пробы. Рассчитывали время полураспада ($T_{1/2}$), клиренс *in vitro* (CL_{int}) и оставшееся количество вещества (% от начального).

Тестирование на ингибирование цитохромов 3A4, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 проводили в соответствии с протоколом производителя Invitrogen – Vivid CYP450 screening kit protocol O-13873-r1 US 0405 в 384-луночном формате. Исследуемые вещества 15 минут предварительно инкубировали с цитохромом в присутствии регенерирующей системы. Затем реакцию инициировали путем добавления в смесь НАДФ⁺ и специфического субстрата, который после расщепления ферментом способен флуоресцировать. После определенного времени (10–45 мин) добавляли стоп-реагент и измеряли флуоресценцию продукта реакции, пропорциональную активности цитохрома. Вещества и контрольный ингибитор тестировали в 8 концентрациях, в двух повторах. Максимальная активность фермента – в присутствии 1% ДМСО, без веществ. Минимальный сигнал – при инкубации без фермента. Соединения тестировали в диапазоне концентраций 0,0046–10 мкМ. В качестве контролей использовали известные специфические ингибиторы изоферментов цитохрома P-450, рекомендованные в протоколе фирмы Invitrogen.

Определение клеточной токсичности и кардиотоксичности

Исследование клеточной токсичности осуществляли с использованием иммортализованной эпителиальной линии клеток печени HepG2.

Определение кардиотоксичности проводили по оценке влияния субстанции на hERG K⁺ ионный канал с помощью *in vitro* тест-системы Invitrogen® Predictor™ hERG. Метод основан на детекции изменяющейся поляризации флуоресценции, которая уменьшается при вытеснении высокоафинного флуоресцентного лиганда – трейсера тестируемым веществом.

Экспериментальные процедуры проводили в соответствии с инструкцией производителя к тест-системе Predictor™ hERG. Суммарный объем реакции составляет 20 мкл, содержание ДМСО – 1%.

2.3 Исследуемые соединения и препараты сравнения

В работе изучены соединения, проявляющие агонистический потенциал в отношении GPR119. Соединение-лидер было выявлено в результате целенаправленного скрининга, а также по результатам *in vitro* и *in vivo* исследований, включающих проведение оценки агонистического потенциала, растворимости, клеточной токсичности, взаимодействия с изоформами CYP450, выраженностью гипогликемического действия у интактных и животных с экспериментальным сахарным диабетом. Структурные формулы неактивных или соединений с низкой активностью представлены в Приложении 3 и Приложении 4.

На этапе оценки гипогликемического действия соединения вводились в дозах от 0,1 до 10 мг/кг, перорально 1 раз в сутки, в виде водной суспензии. В качестве референтных и/или дополнительных (в случае использования комбинированной терапии) препаратов на различных этапах исследования гипогликемического действия использовали: метформин – 400 мг/кг [Ismail Т.А., 2015], ситаглиптин – 5 мг/кг [Vaghasiya J., 2011], при изучении нейропротекторных свойств цитиколин – 500 мг/кг [Парфенов В.А., 2009], которые вводились по аналогичной схеме и способом (1 раз в сутки перорально в виде водной суспензии), а цитиколин вводился внутривентрикулярно 1 раз в сутки после моделирования нарушений мозгового кровообращения. Более подробное описание режима и кратности введения веществ и препаратов сравнения, которые зависели от целей и характера выполняемых исследований, будет представлено в соответствующих главах.

2.4 Дизайн исследования

Общий дизайн исследования представлен на рисунке 3. В результате комплекса *in vitro* и *in vivo* исследований было выявлено соединение лидер под лабораторным шифром ZB-16. На следующем этапе исследования были установлены параметры его острой токсичности, определен терапевтический потенциал. В дальнейшем был проведен комплекс исследований его противодиабетического действия на модели никотинамид-стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета [Masiello P., 1998; Спасов А.А., 2011]. Влияние перорального введения ZB-16, а также его комбинации с метформином и ситаглиптином на массу тела, потребление животными пищи и воды, показатели их липидного и углеводного обмена и выраженность эндотелиальной дисфункции оценивались на модели ожирения вызванного содержанием их на высокожировой и углеводной диете. На модели экспериментального СД у животных оценивалось влияние соединения ZB-16 и его комбинаций с метформином и ситаглиптином на концентрацию глюкозы и уровень гликозилированного гемоглобина в крови, скорость утилизации глюкозы при проведении перорального теста толерантности к глюкозе (ПТТГ), концентрацию инсулина и чувствительность к нему, выраженность нарушений плазменного коагуляционного гемостаза и эндотелиальной дисфункции, а также проводилось изучение морфологических изменений в островковой части ткани поджелудочной железы.

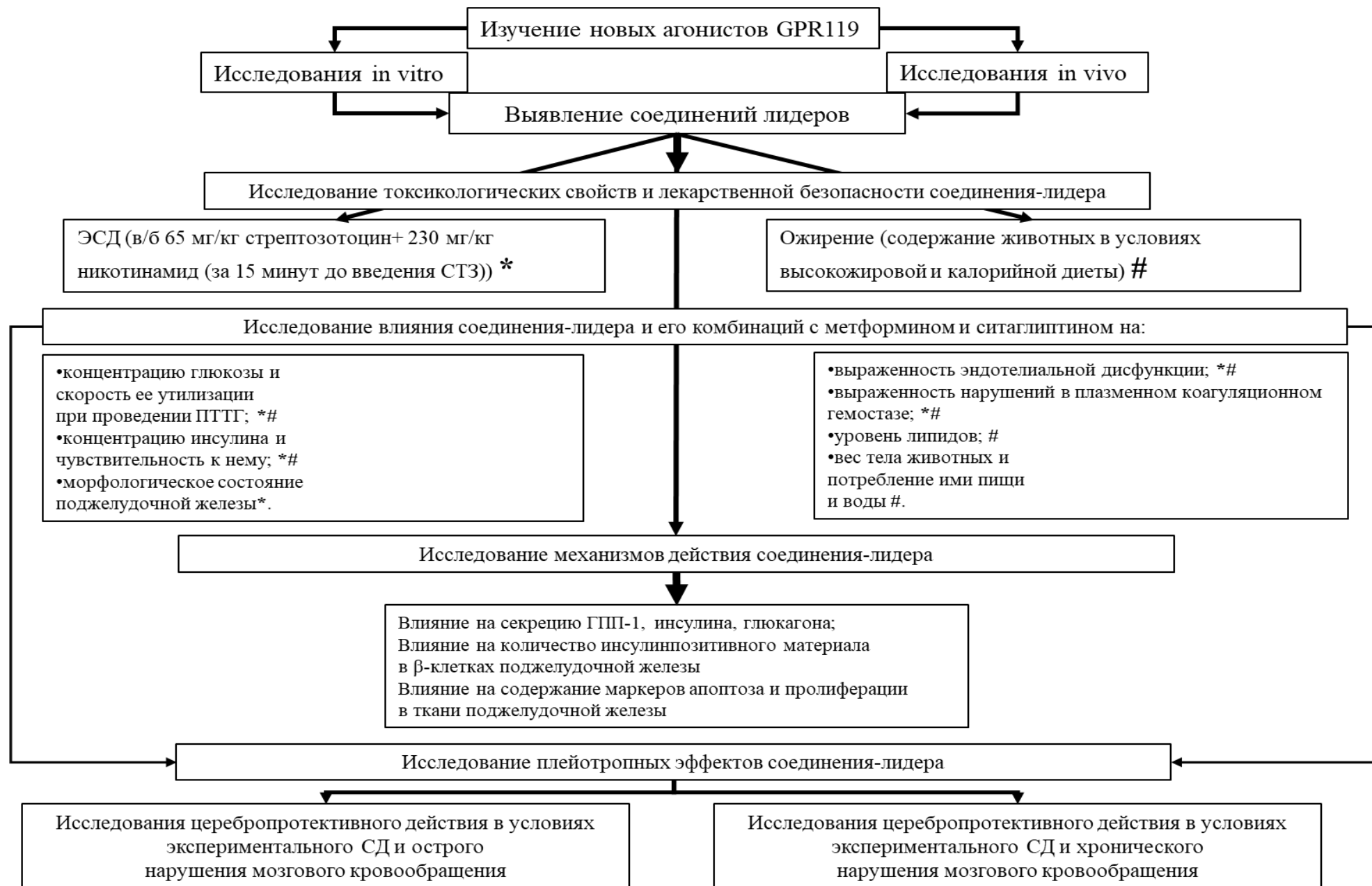


Рисунок 3. Дизайн исследования

На следующем этапе исследования были изучены возможные механизмы гипогликемического действия соединения ZB-16, а именно его влияние на секрецию ГПП-1, глюкагона и инсулина, количество β -клеток, секретирующих инсулин, содержание маркеров апоптоза и пролиферации в них.

Поскольку известны плеiotропные (и в основном церебро- и эндотелиопротективные) эффекты препаратов, пролонгирующих или имитирующих действие эндогенного ГПП-1 (аГПП-1), на завершающем этапе были проведены исследования влияния соединения ZB-16 и его комбинаций с метформином и ситаглиптином на течение острого и хронического нарушения мозгового кровообращения.

Более подробный план исследования будет представлен схематично в начале каждой главы.

2.5 Методы экспериментального моделирования СД

Экспериментальный СД моделировался у животных после ночного голодания путем однократного внутрибрюшинного введения никотинамида (230 мг/кг, Sigma-Aldrich, США) и через 15 минут стрептозотоцина (65 мг/кг, Sigma-Aldrich, США). Через 3 суток у животных измерялся уровень тощачовой гликемии (после 6 ч голодания) глюкометром Контур ТС (Bayer, Германия). Кровь забиралась из подъязычной вены. В исследование включались животные с уровнем гликемии в пределах 8–18 ммоль/л, (указанный диапазон будет уточняться для каждого исследования отдельно).

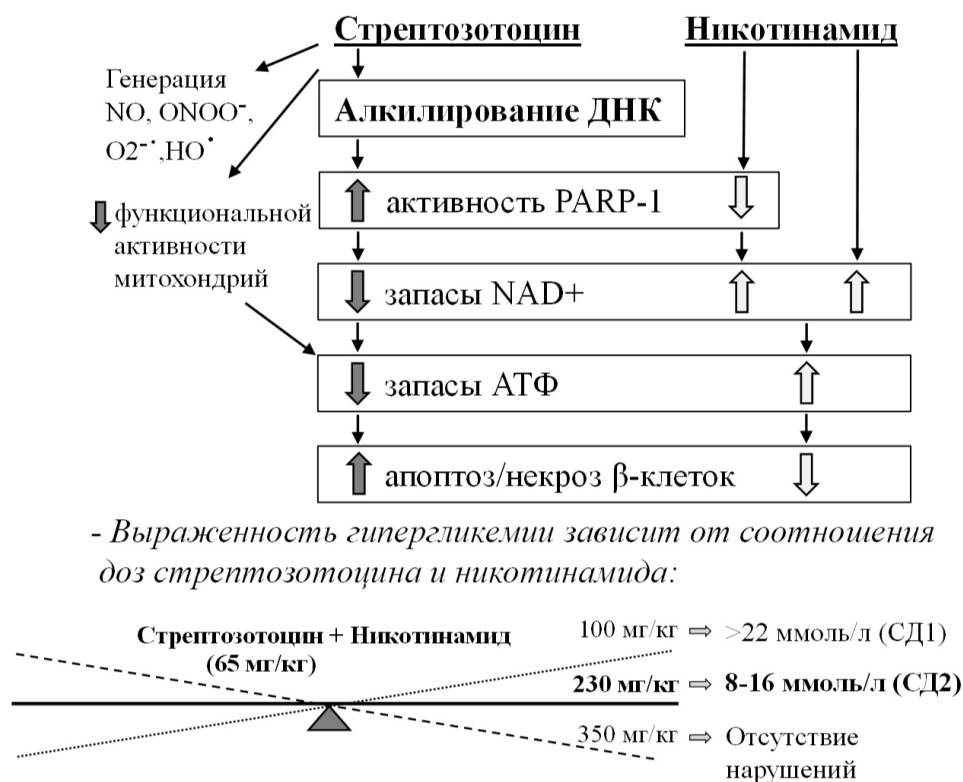


Рисунок 4. Схема развития стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного сахарного диабета

На Рисунке 4 также схематично представлен механизм действия стрептозотоцина и никотинамида, совместное введение которых в определенных дозах позволяет добиться частичного поражения β -клеточной массы с развитием состояния умеренной гипергликемии, характеризующейся нарушением секреции инсулина без развития резистентности к нему [Мазо, В.К., 2016; Спасов А.А., 2011; Masiello P., 1998; Szkudelski T., 2012].

Стрептозотоцин представляет собой цитостатическое средство, ранее применявшееся в терапии инсуломы. Благодаря структурному сходству с молекулой глюкозы стрептозотоцин способен легко проникать в клетки поджелудочной железы путем облегченной диффузии с участием транспортера глюкозы GLUT-2. Цитостатический эффект стрептозотоцина связан с возникающим под его воздействием алкилированием нуклеиновых кислот, что происходит благодаря повышенной генерации активных форм кислорода. Алкилирование ДНК приводит к ошибкам в репарации, которые,

накапливаясь, влекут за собой гибель клетки через активацию механизмов апоптоза. Совместное со стрептозотоцином введение никотинамида позволяет снизить активность PARP-1, что снижает активность SOS-репарации и несколько снижает интенсивность процессов апоптоза, что обеспечивает более мягкое течение экспериментального СД, близкого по картине к СД2, наблюдаемому у человека, но без повышенной секреции инсулина и инсулинрезистентности.

Такая модель СД в значительной степени соответствует определению СД2, которое приводится в национальном руководстве по лечению СД 2017 – «СД2 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., 2017].

2.6 Метод моделирования ожирения

Моделирование ожирения проводили путем перевода животных (старых 21-месячных самцов и молодых 12-месячных самок) на содержание в условиях высокожировой и калорийной диеты. Стандартный рацион животных заменялся на сливочное масло (жирность 8,5%; калорийностью 748 ккал/100 г), подсолнечную халву (532 ккал/100 г) и подсолнечный козинак (576 ккал/100 г), питьевую воду заменяли на 10% раствор фруктозы [Решетняк М.В., 2011]. Самцам соединение ZB-16 и препараты сравнения вводили через 12 недель после начала их содержания на диете. Самкам соединение ZB-16 и его комбинацию с метформином и ситаглиптином начинали вводить сразу после перевода животных на измененный рацион питания.

2.7 Модель острого нарушения мозгового кровообращения

Общий принцип операции по воспроизведению внутрисосудистой обратимой окклюзии средней мозговой артерии представлен на

Рисунок 5.

Наркотизированное животное фиксируют в положении на спине. Шерстяной покров удаляли при помощи депиляционного крема. После обработки операционного поля производят разрез кожи по срединной линии шеи, рассекают подкожную фасцию, выделяют сонный треугольник, образованный сверху двубрюшной мышцей, латерально – грудино-ключично-сосцевидной мышцей и медиально – грудино-подъязычной мышцей. Далее выделяют сосудисто-нервный пучок, который орошают 2% раствором лидокаина. Левую сонную артерию аккуратно отделяют от нервного пучка и подводят под нее лигатуры. Ближе к черепу животного выделяют бифуркацию, а затем внутреннюю и наружную ответвления сонной артерии. После того как все лигатуры подведены (1 под общую сонную (№1), 1 под внутреннюю (№2) и 2 под наружную (№3 и №4)), их обратимо затягивают в порядке: 1, 2 и 4. Затем на наружной сонной артерии делают пункционное отверстие, в которое вставляют нейлоновый окклюдер таким образом, чтобы покрытый силиконом конец окклюдера, пройдя через бифуркацию, оказался во внутренней сонной артерии. Затем узел лигатуры №2 ослабляют и, ориентируясь на метку (20 мм от конца, покрытого силиконом), окклюдер проводят далее по сосуду на расстояние 20–23 мм, после чего лигатуру №4 необратимо перевязывают, а №3 обратимо затягивают, прочно фиксируя окклюдер. На раневую поверхность накладывается увлажняющий гель. Глаза животного должны быть всегда закрыты для предотвращения высыхания роговицы и ослепления животного. На завершающем этапе операции (через 30 минут ишемии) окклюдер извлекается с последовательным утягиванием лигатур. Операционная рана орошается раствором хлоргексидина, ее края сшиваются кисетным

хирургическим швом. В качестве окклюдера используется монофилament 4-0 (Prolene, Ethicon GmbH, Norderstedt, Germany) [Kuge Y., 1995]. Контроль окклюзии проводили по снижению скорости кровотока в проекции средней мозговой артерии, регистрируемой при помощи лазерной доплеровской флоуметрии.

Описанная модель воспроизводилась на фоне 4 недельного СД, что позволяет приблизить дизайн проводимого эксперимента к условиям клиники и позволяет повысить информативность получаемых данных.

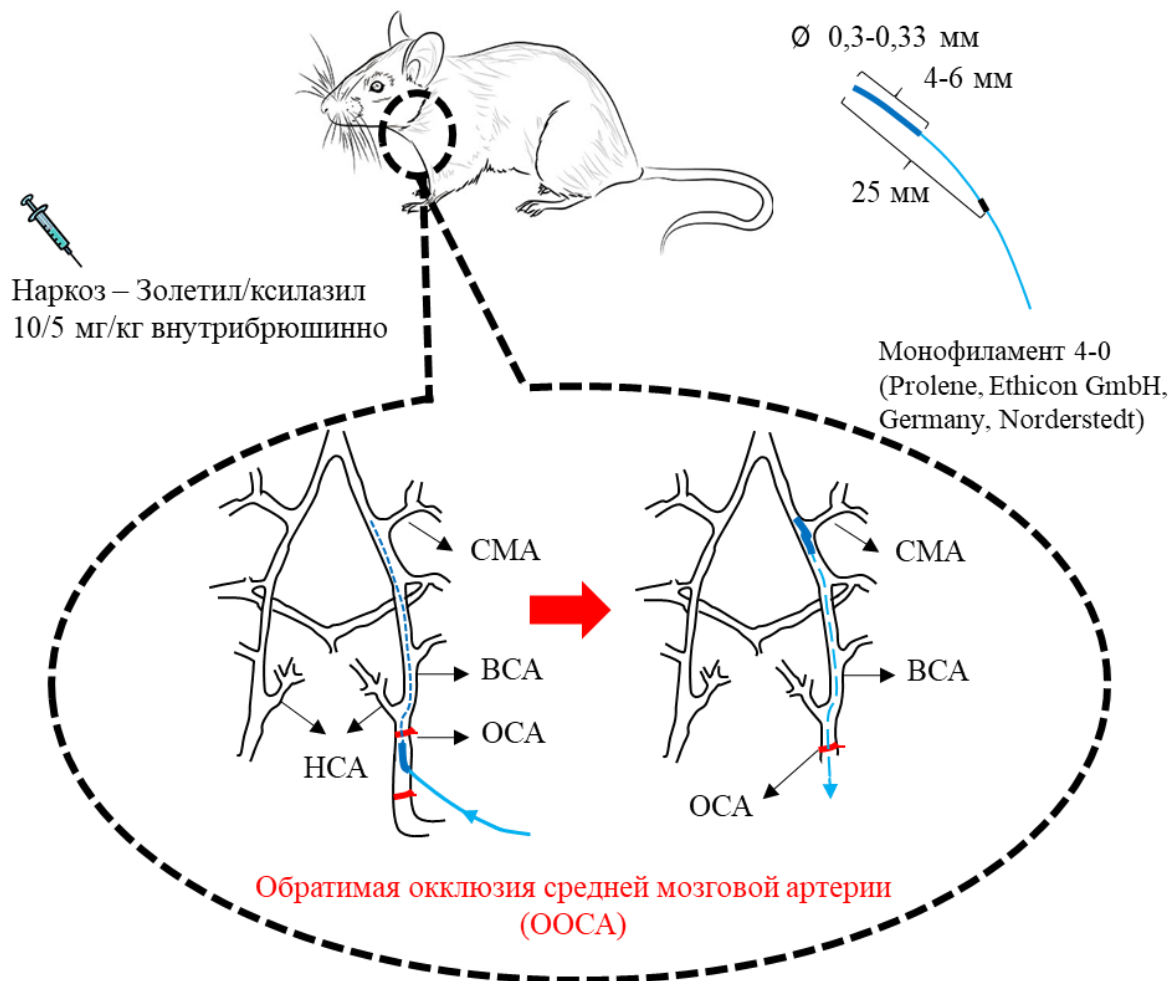


Рисунок 5. Общий принцип операции по воспроизведению обратимой окклюзии средней мозговой артерии. Окклюдер для интраваскулярной окклюзии средней мозговой артерии [Мирзоян Р.С., 2012; Спасов А.А., 2014; Тюреньков И.Н., 2012а, 2013б, 2014; Шмонин А.А., 2011; Koizumi J., 1986; Morris, G.P., 2016]: OCA – общая сонная артерия; HCA – наружная сонная артерия; BCA – внутренняя сонная артерия; CMA – средняя мозговая артерия

2.8 Метод моделирования хронического нарушения мозгового кровообращения

После наркотизации животного осуществляется оперативный доступ к общим сонным артериям по описанной выше схеме, после чего сосуды подвязываются к нейлоновой нити заданного диаметра, затем под контролем скорости кровотока стержень извлекается и сосуд заполняет освободившееся пространство. Диаметр нити подбирался таким образом, чтобы после их изъятия кровотоки по сонным артериям восстановился только на 50% от начального уровня. Общий принцип операции представлен на Рисунке 6.

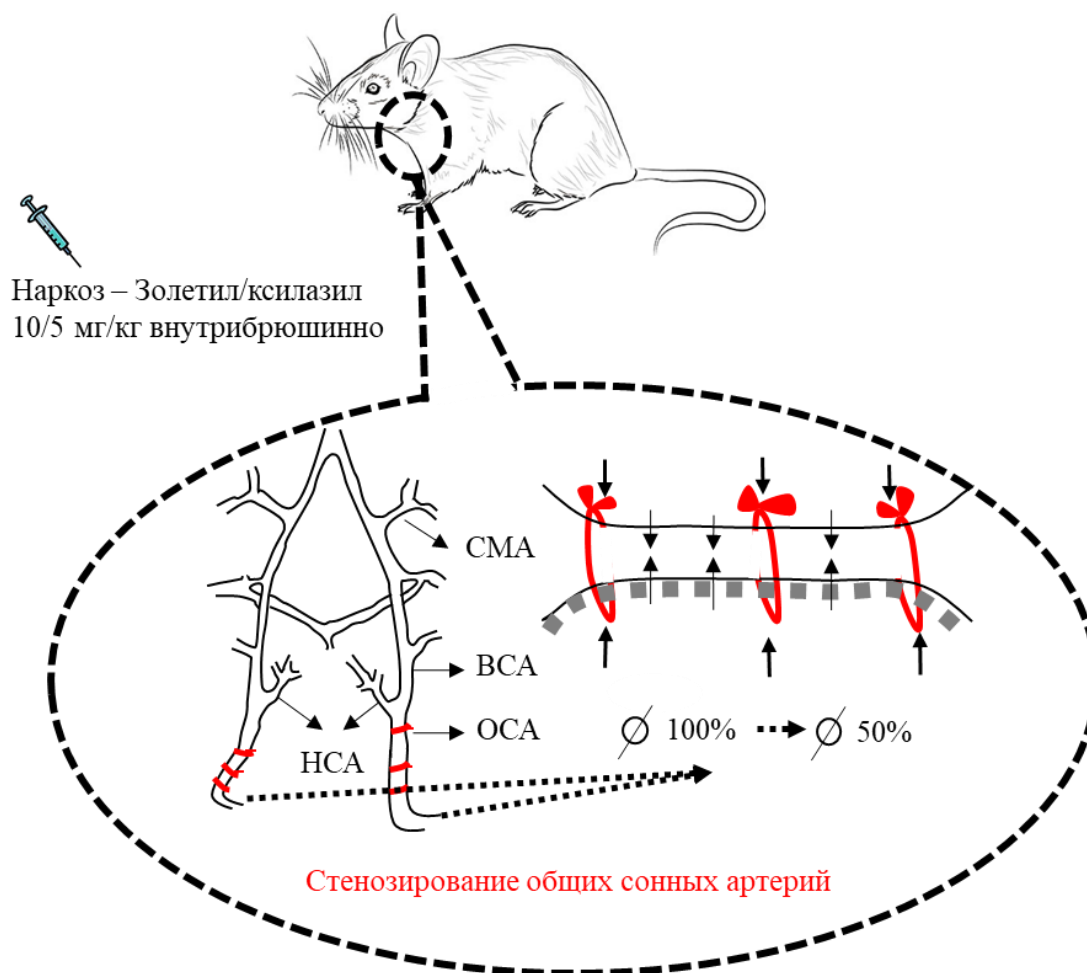


Рисунок 6. Общий принцип моделирования стеноза общих сонных артерий: ОСА – общая сонная артерия; НСА – наружная сонная артерия; ВСА – внутренняя сонная артерия; СМА – средняя мозговая артерия

После ограничения кровотока по артериям рану обрабатывали раствором хлоргексидина и ушивали кистным швом. Моделирование ХНМК проводили за 5 дней до моделирования у этих животных СД и последующей терапии в течении 28 дней. Такой подход повышает валидность методики и информативность получаемых данных, поскольку более значительно отражает клиническую ситуацию.

2.9 Методы определения концентрации глюкозы в крови и проведения ПТТГ

Измерение уровня глюкозы (двойное измерение портативным глюкометром Contour TS, Bayer, Germany) в крови из подъязычной вены проводили после 6-часовой пищевой депривации. Методика была валидированной по определению уровня глюкозы в крови глюкозооксидазным методом [Камышников В.С., 2009] с использованием наборов «Глюкоза ФКД» (Россия).

Пероральный тест на толерантность к глюкозе (ПТТГ) проводили (после 6 часовой пищевой депривации) путем измерения ее концентрации в крови, описанным выше методом, спустя 30, 60 и 120 мин после однократного перорального введения 40% раствора глюкозы (3 г/кг, «глюкозная нагрузка») [Спасов А.А., 2012]. На основании графиков «уровень гликемии-время» рассчитывали площади под кривой, отражающей зависимость «концентрация глюкозы-время».

2.9 Определение чувствительности к инсулину (инсулинорезистентности)

Чувствительность животных к инсулину (в/в, инсулин «Хумалог» (0,8 МЕ/кг)) определяли путем измерения концентрации глюкозы в крови через 15, 30, 60, 120 минут после его внутривенного введения. Чем ниже опускается концентрация глюкозы, тем соответственно выше чувствительность к инсулину и ниже индекс инсулинорезистентности (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance; HOMA-IR; insulin resistance; $\text{HOMA-IR} = \text{инсулин натощак (мкЕд/мл)} \times \text{глюкоза натощак (ммоль/л)} / 25$) [Балаболкин М. И., 2002].

2.10 Метод оценки неврологического дефицита у животных

Неврологический дефицит у животных оценивали с использованием следующих шкал stroke-index McGraw в модификации И. В. Ганнушкиной (1996), 9-балльной шкале Combs и D'Alecy [Combs D. J., 1987] и шкале Garcia [Дайнеко А.С., 2014; Garcia J. H., 1995]. По шкале McGraw судили о наличии у животных следующих симптомов: вялость, тремор, одно- и двусторонние полуптозы и птозы, манежные движения, парезы, параличи конечностей, коматозные состояния и летальные исходы. За каждый симптом присваивался балл (от 0,5 до 10), при наличии нескольких – баллы суммировались. 9-балльная шкала Combs и D'Alecy, позволяющая выявить экстрапирамидные нарушения, включает в себя проведение тестов, оценивающих мышечную силу, цепкость-тягу и равновесие животных. Меньший суммарный балл соответствовал более выраженным неврологическим нарушениям у крыс. По шкале Garcia определяли выраженность следующих показателей: мышечный тонус, двигательную активность, основные физиологические рефлексy, координацию движения, чувствительность. По каждому тесту присваивали следующие баллы: 3 балла

– норма, 2 балла – незначительное нарушение симметричности, 1–0 балла – выраженные нарушения или отсутствие движения.

Координацию движений и мышечный тонус животных изучали также в тесте «Rota-Rod» (установке производства ООО «Нейроботикс», Россия), при этом фиксировали латентный период (ЛП) первого падения (время первого падения животного с вращающегося стержня) и суммарное время удержания крысы на вращающемся стержне за 3 попытки [Bohlen M., 2009].

Чувствительность передних конечностей и их мелкую моторику оценивали в адгезивном тесте. Адгезивный тест выполняли по методике, подробно описанной в ряде работ [Bouet V., 2009; Freret T., 2009], в качестве инородного предмета на волярную поверхность передних лап животного размещали квадратные отрезки лейкопластыря на тканевой основе (0,5 мм², Верофарм, Россия).

2.11 Методы оценки поведения, мнестической и когнитивных функций у животных

Для изучения влияния соединений на поведение, а также когнитивные и мнестические функции проводили стандартные психофармакологические тесты: «Открытое поле-круг» (ОП), «Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ), «Тест экстраполяционного извлечения» (ТЭИ) [Воронина Т.А., 2000, 2012; Островская Р.У., 2012]. Формирование рефлекса в тесте УРПИ и обучение решению экстраполяционной задачи проводили за 24 часа до моделирования патологий.

2.12 Метод регистрации уровня локального мозгового кровотока и определения выраженности эндотелиальной дисфункции

Регистрации уровня локального мозгового кровотока осуществлялась методом лазерной доплерографии (Biopac Systems Inc., США). Датчик

устанавливали в стереотаксической установке, мозговой кровоток животных регистрировался в проекции средней мозговой артерии, доступ к которой осуществляли следующим способом: у наркотизированных животных (хлоралгидрат 400 мг/кг) при помощи депиляционного крема удалялся шерстяной покров верхней поверхности черепа, которая впоследствии скальпировалась. Далее, по стереотаксическим координатам, началом которых принималась точка bregma, определялось место трепанационного отверстия, которое в дальнейшем создавалось с помощью зуботехнического бора с конической фрезой, до твердой мозговой оболочки, которая сохранялась.

Метод оценки вазодилатирующей функции эндотелия сосудов головного мозга

Изучение вазодилатирующей функции эндотелия мозговых сосудов проводилось по методическому подходу, предложенному Тюренковым И. Н., Воронковым А. В. (2008), который заключался в анализе изменений уровня мозгового кровотока в ответ на введение различных модификаторов синтеза эндогенного оксида азота (NO), которые вводились в следующей последовательности: ацетилхолин (0,01 мг/кг, Acros organics, США); нитро-L-аргинина метиловый эфир (10 мг/кг, L-NAME, Acros organics, США). Для оценки эндотелий независимой (ЭНВД) вазодилатации вводили нитроглицерин (0,007 мг/кг, МТХ, Москва). При этом введение последующего анализатора выполняли только после возвращения МК до исходного уровня. По увеличению или уменьшению скорости МК в процентах по отношению к исходному судили соответственно о расширении или сужении просвета сосудов и соответственно о вазодилатирующей функции эндотелия, стимулируемой и базальной продукции NO. Регистрация изменений скорости мозгового кровотока проводилась в проекции средней мозговой артерии крыс с помощью лазерного доплерографа по методу, описанному выше.

Для определения количества десквамированных (циркулирующих) эндотелиальных клеток в крови был использован метод, который основан на подсчете изолированных от тромбоцитов (осаждаются добавлением АДФ) клеток эндотелия. После взятия кровь центрифугировали в течение 10 мин при 200g, затем плазму смешивали с раствором натриевой соли аденозиндифосфата (АДФ-Na). В течение 10 мин аккуратно перемешивали, путем встряхивания пробирки, и повторно центрифугировали для осаждения эндотелиальных клеток. Полученный в результате осадок ресуспендировали в растворе NaCl. В камере Горяева подсчитывали количество эндотелиоцитов в 2 сетках камеры, полученный результат умножали на $10^4/\text{л}$ [Hladovec J., 1978].

2.13 Методы изучения биохимических показателей

Метод определения концентрации прореагировавших с ТБК продуктов (ТБК-АП) в плазме крови

Концентрацию прореагировавших с ТБК-АП продуктов определяли по образованию окрашенного комплекса при взаимодействии продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) с тиобарбитуровой кислотой, с помощью стандартного набора фирмы Агат-Мед (Россия). К 3 мл 1% ортофосфорной кислоты последовательно добавляли 0,25 мл плазмы крови и 1 мл 0,7% раствора тиобарбитуровой кислоты, после чего нагревали на водяной бане в течение 60 минут. Далее пробы охлаждали, добавляли 4 мл бутанола и встряхивали в течение 1 мин до образования однородной белой суспензии. После центрифугирования супернатант фотометрировали при двух длинах волн $\lambda = 535 \text{ нм}$ и $\lambda = 570 \text{ нм}$ 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 продуктов, прореагировавших с ТБК 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.

Метод изучения кислотной резистентности эритроцитов

Забор крови производился шприцем путем пункции венозного сагиттального синуса животного. Для проведения исследования 20 мкл крови смешивали с 20 мл физиологического раствора, чтобы получить взвесь эритроцитов в разведении 1:1000. Измерения оптической плотности взвеси эритроцитов производили на спектрофотометре ПЭ-5400в (ЭКРОС, Россия) при длине волны $\lambda = 600$ нм. В кювету вливали 2 мл взвеси эритроцитов и добавляли к ней в качестве гемолитика 2 мл 0,004 н HCl. С момента введения во взвесь эритроцитов гемолитика величина светопропускания исследуемого раствора начинала изменяться в связи с разрушением клеток крови. Каждые 30 секунд отмечали показания прибора по шкале экстинкции (E_0). Измерение вели до получения двух совпадающих показаний, т.е. до завершения гемолиза (E_n) [Чернецкий Г. А., 2002].

2.14 Методы изучения основных параметров гемостаза крови

Изучение параметров коагуляционного компонента гемостаза, а именно определение тромбинового (ТВ), протромбинового (ПВ), активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) и содержания фибриногена осуществляли хронометрически на анализаторе показателей гемостаза АПГ2-01 «МИНИЛАБ 701» («Юнимед», Россия) с использованием наборов реактивов производства НПО «Ренам» (Россия). Кровь для анализа забирали из брюшной аорты, все анализы проводились на бедной тромбоцитами плазме, полученной после центрифугирования

образцов цитратной крови при 3000 об/мин в течении 15 минут [Баркаган З. С., 2001].

2.15 Иммуноферментный анализ

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).

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).

Определение концентрации белков и активных молекул осуществляли в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов фирмы «Cusabio-Rat» (Китай) на ИФА-комплексе фирмы Тесан (Австрия). В работе на разных этапах исследовали уровень следующих биологически активных агентов: ГПП-1, глюкагона, инсулина.

2.16 Определение зоны инфаркта мозговой ткани при ОСМА

Количественную оценку размера некроза выполняли путем анализа цифровых фотографий срезов мозга, обработанных 0,2% раствором 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида, который, взаимодействуя с ферментами группы

дегидрогеназ, приобретает малиновую окраску [Brait V. H., 2010]. Для этого изготавливались срезы больших полушарий толщиной 2 мм, которые затем инкубировались в 0,2% растворе 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида при 37°C в течение 20 минут. После окрашивания срезы фотографировались в одной плоскости с миллиметровой линейкой. При помощи программного обеспечения ImageJ определяли площадь окрашенной и неокрашенной ткани. Для избегания возможного завышения размера некроза вследствие отека, учитывался скорректированный объем зоны инфаркта (ЗИ), который рассчитывался в процентах относительно объема интактной гемисферы по упрощенной формуле: $ЗИ = ((B - (A - C))/B) * 100\%$, где A – суммарная площадь пораженных гемисфер на срезах (мм²), B – суммарная площадь интактных гемисфер на срезах (мм²), C – суммарная площадь зон инфаркта на срезах (мм²).

2.17 Морфологические методы исследования[‡]

После эвтаназии животных (хлоралгидрат 800 мг/кг в/в) извлекали ткань поджелудочной железы и головной мозг. Парафиновые срезы ткани поджелудочной железы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятым методикам [Снигур Г. Л., 2010, Sun G., 1997]. Для проведения иммуногистохимического исследования использовались мышинные моноклональные антитела к инсулину (клон 1G4, GeneTex) в разведении 1:100. Для изучения апоптоза использовали первичные антитела против каспазы 3 (мышинные моноклональные антитела, клон 3F49, GeneTex) в разведении 1:50. Для определения пролиферативной активности использовали первичные антитела к белку Ki-67 (кроличьи поликлональные антитела, LifeSpan BioSciences) в разведении 1:50. Данный вид исследования выполняется по стандартным протоколам в соответствии с инструкциями фирм производителей

[‡] Выполнено совместно с сотрудниками кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО ВолгГМУ за что выражаем искреннюю благодарность

реактивов. Для визуализации использовали полимерную систему EnVision (Thermo Scientific, Fremont, CA); хромогендиамино-бензидин. Препараты докрашивали гематоксилином и исследовали с помощью микроскопа Axiostar plus («Карл Цейс», Германия); объектив $\times 10$, $\times 40$, окуляр $\times 10$, цифровая камера Canon (Japan, 5.0 мегапикселей). Морфометрическое исследование проводили с помощью компьютерной программы «Видео Тест-Морфо-4» (Россия). Определяли периметр панкреатических островков (L, мкм) и их площадь (S, мкм²). Экспрессию инсулина оценивали путем определения абсолютной и относительной площади иммунореактивного материала (β -клеток). Оценка результатов иммуногистохимической реакции осуществлялась по интенсивности окраски с использованием полуколичественной шкалы (негативная, слабая, умеренная, выраженная). Морфометрию тканей головного мозга проводили при окрашивании срезов по Нисслю.

Микрофотосъемку гистологических препаратов проводили на микроскопе «Micros» (Austria) цифровой фотокамерой «Olympus» (Japan).

2.18 Острая токсичность

Острую токсичность при однократном введении изучали на мышах и крысах обоего пола массой 18–22 и 180–220 г соответственно. Соединение вводили животным внутрижелудочно в различных возрастающих дозах однократно. Наблюдение за животными проводили в течение 14 суток, отмечая клинику отравления и количество погибших животных.

2.19 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 6 (GraphPad Software Inc., США). Для проверки распределения на нормальность

использовали критерий Шапиро-Уилка. В зависимости от характера данных использовали следующие методы статистического анализа: однофакторный дисперсионный анализ (One-Way ANOVA) либо ранговый однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с последующим применением апостериорных (post hoc) критериев (t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони либо критерия Данна). Статистически значимыми расценивались различия при $p < 0,05$ [Гланц С., 1999; Реброва О. Ю., 2006].

ГЛАВА 3. СКРИНИНГ СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ АГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ GPR119

На первом этапе исследования было проведено изучение некоторых параметров соединений, проявляющих агонистическую активность в отношении GPR119, которые могут повлиять на их фармакотерапевтический потенциал. После этого соединения, отвечающие параметрам растворимости, клеточной безопасности и метаболизма оценивались, по их способности влиять на концентрацию глюкозы при пероральном введении интактным и животным с экспериментальным СД.

3.1 Поиск агонистов GPR119, отбор соединений по результатам исследований *in vitro*[§]

На основании выборочного HTS (high throughput screening) – высокопроизводительного скрининга библиотеки, состоящей из 1,5 млн малых органических молекул, были взяты две, на первый взгляд, перспективные серии веществ. Структуры наиболее активных представителей этих двух избранных первоначально серий приведены на рис.7.

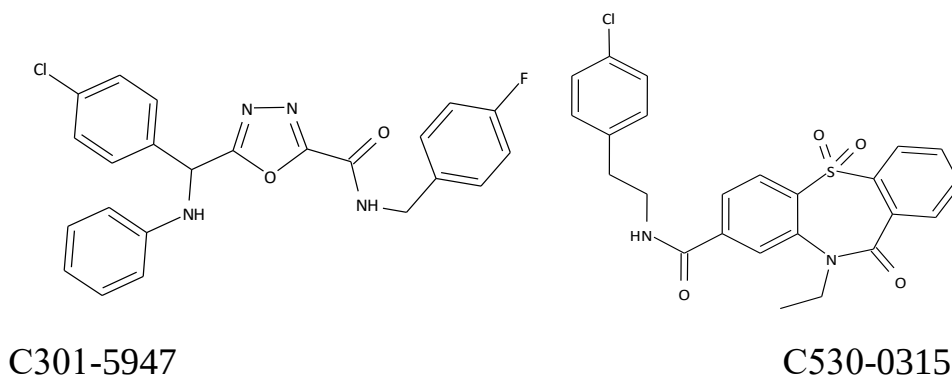


Рисунок 7. Формулы веществ-лидеров двух первоначальных серий

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

Вещества серий C301-5947 и C530-0315 были ресинтезированы для детального анализа их строения аналитическими методами, а также проведения биохимических испытаний. Кроме них, были синтезированы или отобраны из имеющихся в библиотеке еще 40 подобных веществ.

Все соединения были проскринированы на первичную агонистическую активность (для каждого была определена EC_{50} , M) для обнаружения и анализа возможных закономерностей структура-эффект и дальнейших целенаправленных структурных модификаций. Результаты скрининга на активность представлены в Приложениях 2 и 3, при этом во втором представлены формулы неактивных или соединений, активность которых оказалась незначительной, в третьем приведены формулы соединений, которые оказались пригодны для модификации.

После анализа данных по активности был сделан вывод, что небольшие изменения в структуре соединений приводят к значительному снижению или полной потере их активности. Уровень активности изначальных веществ (C301-5947, C530-0315) был незначителен. Вещества других серий под шифрами D216-0545, D469-0068 и K205-1693 также не показали высокой агонистической активности.

Проанализировав находящиеся в свободном доступе формулы веществ, участвовавших в клинических испытаниях, а путем «встраивания» в их структуру новых, оригинальных элементов, разработали следующую серию экспериментальных соединений. Вначале она была спроектирована с привлечением *in silico* (компьютерного) моделирования и затем уже синтезирована.

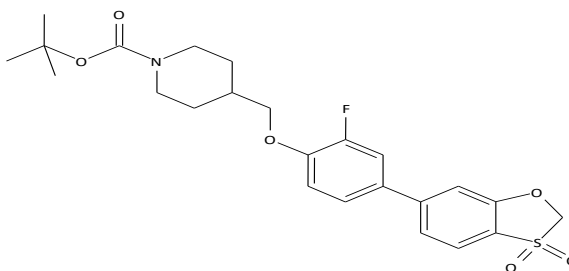


Рисунок 8. Структура первого соединения серии ZB (ZB-09)

Первое вещество серии (Рисунок 8) при скринировании показало активность EC_{50} 4 нМ. На этом этапе была произведена оценка его отдельных параметров ADME (absorption, distribution, metabolism and excretion – параметры всасывания, распределения, метаболизма и выведения) с целью выявления возможных недостатков в фармакокинетических свойствах соединения [Singh S. S., 2006].

Растворимость была оценена в сравнении с рекомендуемыми стандартами. Результаты представлены в Таблице 4.

Таблица 4

Растворимость ZB-09 при различных pH

Тестируемое вещество	Растворимость UB, 2% DMSO		
	pH 2, uM	pH 4, uM	pH 7, uM
ZB-09	< 3	< 3	< 3
Диэтилстильбэстрол	12	10	12
Верапамил	212	203	190

Первичное соединение (ZB-09) обладает крайне плохой растворимостью в воде во всем диапазоне значений pH, что существенно ограничивает его дальнейшее использование.

Следующим этапом было определение стабильности вещества в микросомах (человека, крысы и мыши) для оценки потенциальной скорости метаболизма вещества в печени, поскольку это важно с точки зрения времени полужизни в крови, максимально достижимой концентрации в крови, частоты приема лекарственного средства и т.д. Данные по микросомной стабильности вещества ZB-09 представлены в табл.5.

Микросомы печени – субклеточная фракция, содержащая основные метаболические ферменты, такие как цитохромы P450, флавино-монооксигеназы, УДФ-глюкуронозил трансферазы, карбоксиэстеразы, гидролазы и другие. Доступность микросом, получаемых из печени различных видов млекопитающих, делает их одним из широко используемых

средств для оценки метаболизма (предсказание возможных метаболитов, идентификация цитохромов, отвечающих за метаболизм исследуемого препарата) новых химических соединений [Singh S. S., 2006].

Таблица 5

Микросомальная устойчивость ZB-09

Микросомы	<u>t_{1/2}, min</u>	<u>CL_{int}</u>	<u>CL_{int, hep}</u>	<u>CL_h</u>	<u>ER</u>
Человека	4,16	0,6664	770,6916	20,44	0,94
Крысы	31,08	0,0892	160,56	40,97	0,74
Мыши	8,57	0,3236	1274,175	84,06	0,93

Микросомальная устойчивость ZB-09 невысока и в случае микросом человека время полужизни (время падения концентрации вещества вдвое в присутствии микросом) составляло всего 4 минуты, что указывает на потенциально высокую метаболизируемость соединения под действием ферментов печени. Это может повлечь за собой укорочение периода полувыведения препарата и снижение его максимальной плазменной концентрации до уровня, недостаточного для развития терапевтического эффекта.

Таким образом, анализ первичных выборочных данных из панели ADME указал на проблемные свойства соединения ZB-09 и помог сфокусировать работу над их улучшением путем модификации структуры. Прежде всего, было необходимо повысить растворимость и микросомальную устойчивость веществ.

Анализ структуры соединения ZB-09 показывает, что оно содержит в себе третбутил-оксикарбонильную группу, которая, во-первых, обладает высокой липофильностью (средством к неполярным растворителям, что обычно способствует снижению водорастворимости), и, во-вторых, эта группа считается метаболически неустойчивой (и химически малоустойчивой, особенно в кислой среде – ограничение перорального

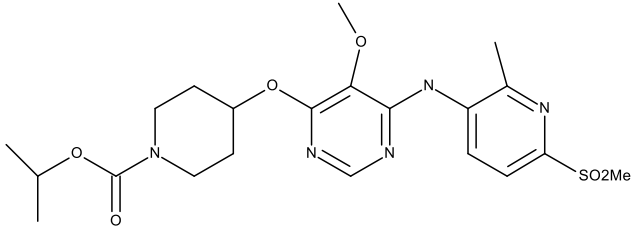
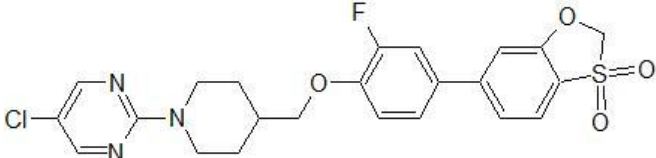
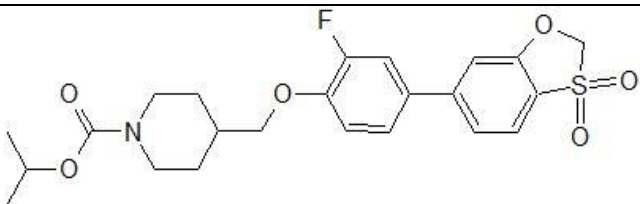
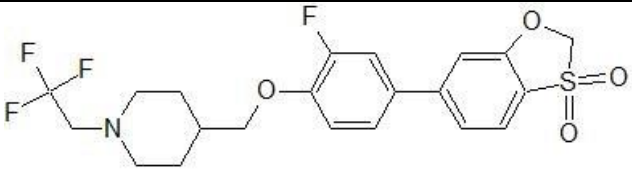
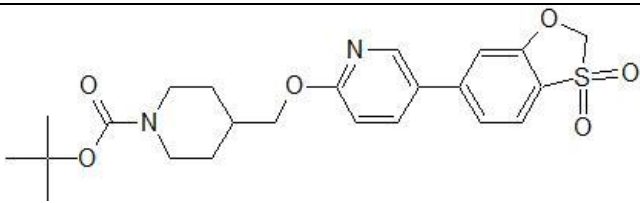
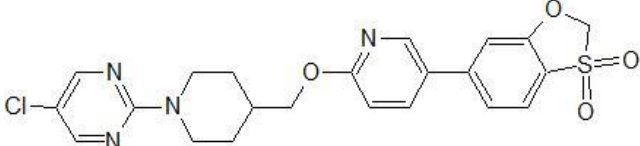
приема). Таким образом, в структуру веществ данной серии требовалось внести следующие изменения: найти приемлемый биоизостерный заместитель для третбутил-оксикарбонильной группы и ввести в структуру радикалы, обладающие большей гидрофильностью.

Биоизостер третбутил-оксикарбонильной группы должен примерно соответствовать ей по размеру и по распределению в нем электронной плотности, а также по расположению полярных (способных к образованию водородных связей) и липофильных частей. Одним из простейших, классических вариантов является попытка замены третбутил-оксикарбонильной группы другими уретановыми фрагментами, например, изопропил-оксикарбонильной группой. Исходя из этих предположений, синтезировали структуру ZB-17. Неклассический биоизостер третбутил-оксикарбонильной группы – это гетероциклическая ароматическая структура, где атомы азота в какой-то степени являются замещающими в место атомов кислорода оксикарбонила, а дополнительные заместители используются для модулирования липофильности. Таким образом, была синтезирована молекула под шифром ZB-16 с хлорпиримидиновым заместителем у атома азота вместо уретанового. Также была предпринята попытка несколько изменить размер замещающей группы без изменения ее липофильности и полярности, что стало возможно благодаря замене третбутил-оксикарбонильной группы на трифторэтильную. При этом дополнительные атомы фтора на алифатическом фрагменте играют двоякую роль – во-первых, они модулируют липофильность (больше атомов фтора – выше липофильность), и, во-вторых, они, за счет своей электроотрицательности, повышают электроакцепторный эффект заместителя, приближая «электронное воздействие» алкильного заместителя к воздействию оксикарбонильного (т.е. азот в такой группе не приобретает ярко выраженного основного характера, как в случае просто алкильной группы). Таким образом, была предложена структура ZB-18.

Структуры и активности синтезированных аналогов ZB-09 приведены в табл.6.

Таблица 6

Структура и активность аналогов ZB-09

Шифр соединения	Структура	Макс. Конц. (нМ)	EC ₅₀ М
Arena (0119)		10	9,01 нМ
ZB-16		30	7,25 нМ
ZB-17		30	12,5 нМ
ZB-18		30	63,5 нМ
ZB-19		30	11,0 нМ
ZB-20		30	29,3 нМ

Наличие в середине молекулы высоколипофильного фторфенильного структурного фрагмента вносит свой вклад в низкую растворимость конечного вещества в водных средах. Биоизостером фенила с несколько большей гидрофильностью, за счет потенциального образования водородных

связей по атому азота, может являться пиридин. В результате, был разработан дизайн вещества ZB-19, где в молекулу вместо фторфенила в средней части молекулы «встроен» пиридин. В структуре ZB-20 торцевая третбутил-оксикарбонильная группа замещена хлорпиримидином, что предположительно повысит стабильность в микросомах.

Аналитические данные показывают, что все синтезированные аналоги ZB-09 имеют высокую агонистическую активность в отношении GPR119. При этом можно отметить, что замена третбутил-оксикарбонильной группой ее возможными биоизостерами не привела к существенному падению активности (за исключением некоторого снижения активности в случае трифторэтильной группы). Следующим этапом был анализ выборочных ADME параметров для оценки влияния произведенных изменений структуры на целевые свойства молекул. Анализ растворимости в воде при разных значениях pH представлен в табл.7.

Таблица 7

Растворимость аналогов ZB-09 в воде при разных pH

Тестируемое вещество	Растворимость 2% ДМСО		
	pH 2, мкМ	pH 4, мкМ	pH 7, мкМ
Диэтилстильбэстрол	15	14	14
Верапамил	203	200	191
ZB-16	52	< 3	4
ZB-17	< 3	< 3	< 3
ZB-18	25	< 3	< 3
ZB-19	< 3	< 3	< 3
ZB-20	< 3	< 3	< 3

Данные по растворимости синтезированных соединений показывают, что замена третбутил-оксикарбонильной группы на изопропил-оксикарбонильную не приводит к улучшению растворимости в воде ни при одном из значений pH. Однако замена этой группы на трифторэтил и особенно на хлорпиримидин дает полученным соединениям повышение

растворимости в кислой (pH = 2) среде, что может благоприятно сказаться на параметрах абсорбции в желудке и потенциально улучшить фармакокинетику препаратов.

Микросомальная устойчивость соединений-лидеров

Отобранные по совокупности высокой *in vitro* активности, а также лучшей растворимости, соединения ZB-16, ZB-19 и ZB-20 были оценены по уровню их устойчивости к микросомальным ферментам (табл.8).

Как видно из таблицы, вещество ZB-16 обладает значительно большей устойчивостью в микросомах человека и крысы по сравнению с исходным веществом серии ZB-09 (табл.8). Таким образом, биоизостерное замещение третбутил-оксикарбонильной группы на неклассический биоизостер – хлорпиримидиновый фрагмент позволил улучшить оба проблемных параметра серии – низкую растворимость в воде (возрастает при снижении pH) и микросомальную устойчивость.

Таблица 8

Микросомальная устойчивость исследуемых соединений

Микросомы	<u>t_{1/2}, min</u>	<u>CL_{int}</u>	<u>CL_{int, hep}</u>	<u>CL_h</u>	<u>ER</u>
ZB-16					
Человека	42,52	0,0652	75,4038	16,43	0,76
Крысы	64,77	0,0428	77,04	32,09	0,58
ZB-19					
Человека	2,50	1,1076	1280,939	20,66	0,95
Крысы	21,93	0,1264	227,52	44,29	0,81
ZB-20					
Человека	40,76	0,068	78,642	16,57	0,76
Крысы	130,75	0,0212	38,16	22,53	0,41

Вещество ZB-19 обладает высокой агонистической активностью (*in vitro*), однако наличие торцевой третбутил-оксикарбонильной группы делает его неустойчивым к действию печеночных ферментов. Соединение ZB-20, где по аналогии с ZB-16 третбутил-оксикарбонильная группа заменена устойчивым биоизостером гетероциклической природы – хлорпиримидином,

не обладало лучшей растворимостью в водных средах (как наблюдалось в случае ZB-16), но зато было более устойчиво к действию печеночных ферментов. Это соединение обладает активностью *in vitro* EC₅₀ 29 нМ, что немного уступает ZB-16.

Кардиотоксичность соединений-лидеров

Следующим этапом была оценка возможной кардиотоксичности, что было оценено по параметру связывания с hERG – калиевым каналом, блокирование которого признано потенциально опасным [De Bruin M.L., 2005]. Результаты связывания hERG соединениями серии ZB представлены в табл.9.

Таблица 9

Связывание hERG соединениями серии ZB

Тести- руемое вещество	Конц. мкМ	HillSlope	EC ₅₀ , М	LogE C50	Усредненная Поляризация mP (n = 4)	SD	CV %	Несвязан ный hERG %
Стандарт	4	-0,72	22,8 нМ	-7,6				
ZB-16	10	-	-	-	244	4,5	1,8	77
ZB-16	1	-	-	-	264	8,7	3,3	89
ZB-20	10	-	-	-	263	4,6	1,7	91
ZB-20	1	-	-	-	261	4	2	89

Примечание. Потенциально-опасным считается связывание более 50% hERG. Исследуемые вещества связывают менее 50% hERG при обеих протестированных концентрациях – 10 и 1 мкМ.

Клеточная токсичность соединения ZB-16

Исследование клеточной токсичности осуществляли с использованием иммортализованной эпителиальной линии клеток печени HepG2. Клеточная токсичность вещества ZB-16 оценивалась как функция, прямо пропорциональная снижению жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток оценивали по количеству продуцируемого клеточной культурой АТФ. В качестве экспериментальной платформы была выбрана тест-система Cell Titer Glo Cell Viability (Promega) [Pierce C. G., 2014]. Туберцидин, ингибитор

разнообразных метаболических процессов в клетке, был использован в качестве положительного контроля эксперимента. Для ZB-16 проанализировали зависимость клеточной токсичности от концентрации вещества. В качестве количественного параметра для оценки клеточной токсичности использовали величину IC_{50} . Расчет параметра IC_{50} : для расчета эффективности ингибирования (% Инг.) использовали формулу: $\% \text{ Инг.} = [(Л_{\text{поз}} - Л_{\text{экс}}) / Л_{\text{поз}} - Л_{\text{отр}}] \times 100\%$, где $Л_{\text{поз}}$ – положительный контроль, люминесценция в ячейках с клетками без вещества; $Л_{\text{отр}}$ – отрицательный контроль, люминесценция в ячейках со средой без клеток; $Л_{\text{экс}}$ – люминесценция в ячейках с веществом в определенной концентрации. Значения IC_{50} затем рассчитывали при помощи программы GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) по критерию минимизации квадратов отклонения экспериментальных точек от теоретической кривой (Рисунок 9).

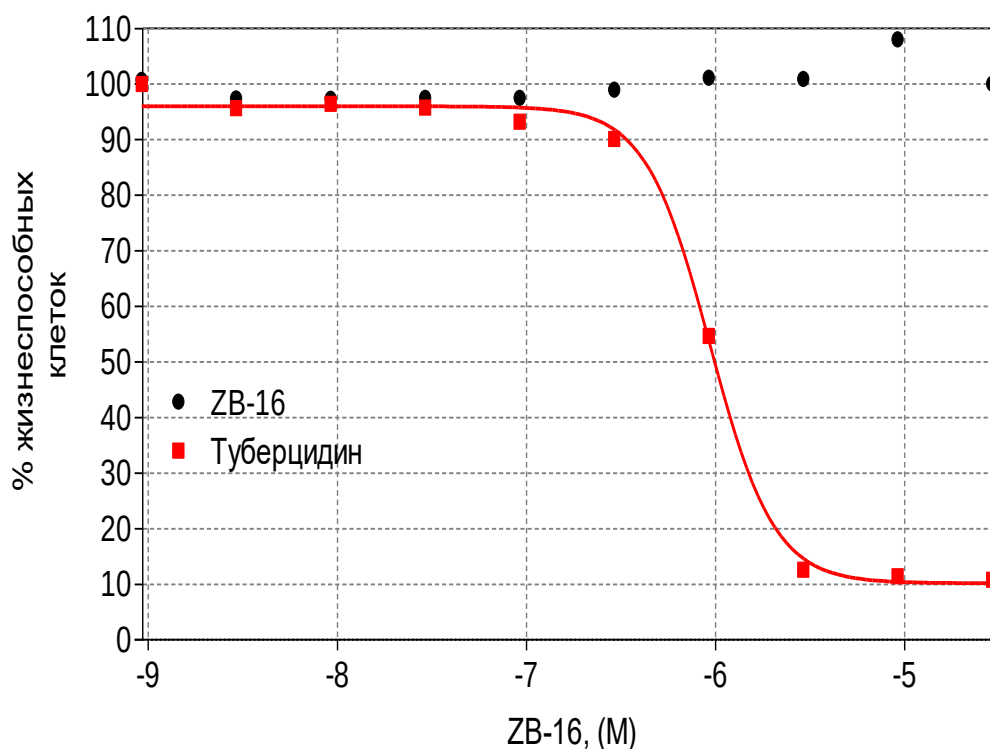


Рисунок 9. Клеточная токсичность ZB-16 определенная на клетках НерG2. Концентрационная зависимость клеточной токсичности ZB-16 и контрольного вещества туберцидина в отношении культуры клеток

НерG2, демонстрирующая жизнеспособность клеток после добавления веществ

Таким образом, соединение ZB-16 не проявляет клеточной токсичности в широком диапазоне концентраций.

Ингибирование CYP450 соединениями-лидерами

Возможность нарушения метаболизма других лекарственных средств и биоконпонентов в организме оценивается при помощи измерения ингибирования ими ферментов CYP450. В случае значительного ингибирования высока вероятность изменения метаболизма других лекарственных средств, что может повлечь за собой повышение вероятности возникновения нежелательных реакций и требует особой осторожности при назначении сочетанной терапии. Параметры ингибирования CYP450 соединениями ряда ZB приведены в табл.10.

Таблица 10

Ингибирование соединениями ряда ZB-16 и ZB-20 (IC_{50} , М > 10 мкМ) и веществами стандартами изоформ CYP450

СYP изоформа	2C9- BOMF	3A4- BOMCC	3A4- DBOMF	1A2- EOMCC	2C19- EOMCC	2D6- EOMCC
ID	Hillslope	Hillslope	Hillslope	Hillslope	Hillslope	Hillslope
ZB-16A > 10 мкМ	--	--	--	--	--	--
ZB-20 > 10 мкМ	--	--	--	--	--	--
Референсный ингибитор	Сульфа- феназол	Кетоко- назол	Кетоко- назол	α -Нафто- флавон	Мико- назол	Хинидин
Ref. inh. IC_{50}	350 нМ	69 нМ	11 нМ	16 нМ	29 нМ	3 нМ
Ref. inh. IC_{50} (Invitrogen)	210 нМ	70 нМ	6 нМ	30 нМ	40 нМ	10 нМ

Представленные в табл.10 данные свидетельствуют о том, что оба соединения не ингибируют ни одну из изоформ CYP450, что указывает на

отсутствие потенциала для нарушения метаболизма других лекарств (табл.10).

Исследование агонистической активности лидера

Исследование специфической активности осуществляли с использованием линии клеток CHO-K1, в которых был стабильно экспрессирован человеческий рецептор GPR119 (hGPR119). Агонистическая активность соединения ZB-16 оценивалась по возрастанию внутриклеточной концентрации цАМФ, так как из литературы известно, что активация рецептора hGPR119 путем последующей стимуляции клеточной аденилатциклазы ведет к повышению внутриклеточного содержания цАМФ. В качестве экспериментальной платформы была выбрана тест-система Lance Ultra cAMP (Perkin Elmer). Известные агонисты рецептора hGPR119 были использованы в качестве положительного контроля и для определения абсолютной величины максимального сигнала эксперимента. Для ZB-16 была проанализирована зависимость агонистической активности вещества от его концентрации. Величина EC_{50} была определена из полученного графика (Рисунок 10). Для построения концентрационной зависимости было выбрано

уравнение:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(LogEC_{50} - X) \cdot HillSlope}}$$

где Top – максимальный сигнал,

Bottom – минимальный сигнал,

Hillslope – угла наклона кривой,

$LogEC_{50}$ – логарифм значения EC_{50}

EC_{50} – эффективная концентрация, которая в данном тесте определялась как концентрация, которая вызывала достижение 50% от максимального эффекта.

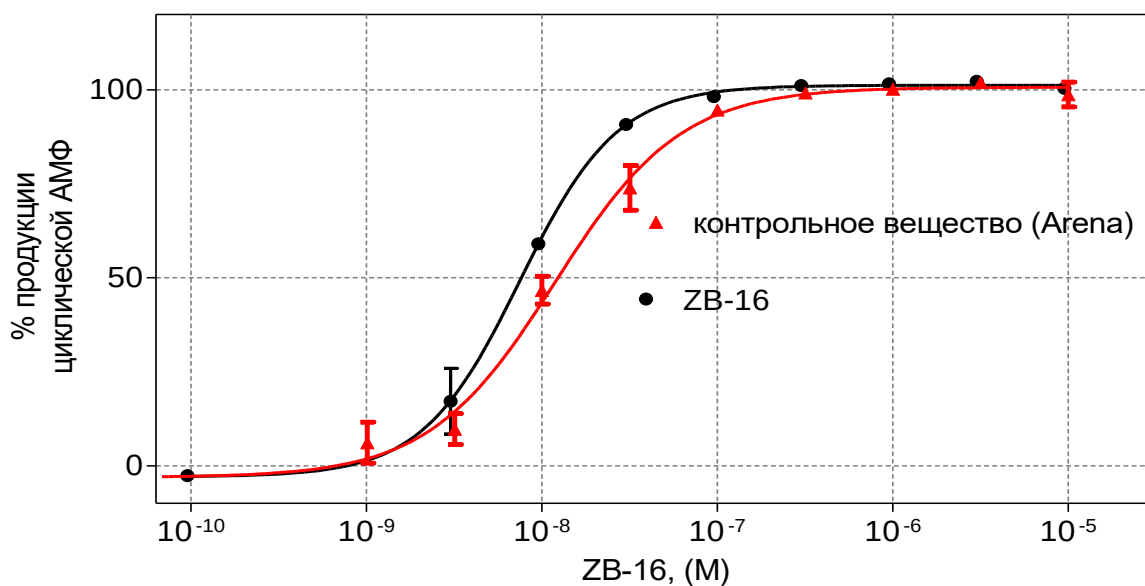


Рисунок 10. Концентрационная зависимость агонистической активности вещества ZB-16 и контрольного вещества (Arena) в отношении целевого рецептора hGPR119. Каждая концентрационная точка представляет собой усредненное значение для двух повторов

Таблица 11

Специфическая активность ZB-16 на целевом рецепторе GPR119, полученная в двух независимых экспериментах

Вещество	Макс. Конц. (мкМ)	% активности вещества при максимальной концентрации	EC ₅₀ , (нМ)	№ эксперимента
ZB-16	30	99	7,3	1
ZB-16	30	100	9,7	2

Соединение ZB-16 проявляет наномолярную агонистическую активность на целевом рецепторе GPR119, являясь полным его агонистом (рис.10, табл.11).

Совокупность параметров ADME и высокой *in vitro* активности позволила нам продолжить изучение вещества ZB-16, проанализировать его гипогликемическую активность *in vivo*.

3.2 Изучение гипогликемического действия соединений-лидеров**

3.2.1. Изучение гипогликемического действия соединений-лидеров на интактных животных

Аналоги ZB-09 были протестированы в *in vivo* экспериментах на наличие у них гипогликемического действия, при этом в исследования были включены все синтезируемые соединения, за исключением ZB-19 (табл.12).

Пероральное однократное введение интактным крысам соединений ZB-16 и ZB-20 в дозах 0,1 и 1 мг/кг и соединения ZB-17 в дозах 1 и 10 мг/кг (табл.12) вызывало статистически-значимое снижение глюкозы в крови. Введение остальных соединений интактным животным не влияло на уровень гликемии.

** Исследование выполнено совместно с к.м.н. Д.А. Бакулиным, О.Е. Логвиновой

Таблица 12

**Гипогликемическое действие аналогов ZB-09 на интактных крыс
(однократное пероральное введение)**

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

Примечание. * Различия статистически значимы с группой интактных животных $p < 0,05$

3.2.2. Оценка гипогликемического действия агонистов GPR119 на животных с экспериментальным СД

Экспериментальный СД моделировался у животных после ночного голодания посредством однократного внутривентриального введения никотинамида (230 мг/кг, Sigma-Aldrich, США) и стрептозотоцина (65 мг/кг, Sigma-Aldrich, США) с интервалом 15 минут. Через 3 суток у животных измерялся уровень тощачковой гликемии (после 6 ч голодания). В исследование включались животные с уровнем гликемии в пределах 10–18 ммоль/л. Экспериментальные группы формировались таким образом, чтобы среднее и медианное значение уровня гликемии варьировало между группами в пределах 0,5 ммоль/л. Далее, в течение 4 недель (ежедневно, однократно) животным перорально вводили исследуемые соединения и препараты сравнения в виде водных растворов, приготовленных *ex tempore*. В качестве препаратов сравнения были выбраны ингибитор ДПП-4 ситаглиптин (Янувия, Merck Sharp & Dohme B.V., Нидерланды, 5 мг/кг) и бигуанид метформин (Глюкофаж, Merck Sante, Франция, 400 мг/кг). Дозы препаратов сравнения были выбраны согласно литературным данным [Ismail T.A., 2015; Poucher S.M., 2012; Vaghasiya J., 2011]. Поскольку известные агонисты GPR119 в эксперименте проявляют выраженную гипогликемическую активность в диапазоне доз от 0,1 до 10 мг/кг [Ritter K., 2016], эффективность исследуемых соединений оценивалась в дозах 0,1, 1 и 10 мг/кг.

Спустя 7, 14 и 28 дней после начала «лечения» у животных измерялся уровень тощачковой гликемии и проводился ПТТГ. Расчет площади под кривой (AUC) «уровень гликемии-время» проводился по 4 временным точкам: до введения глюкозы (0 минут), через 30, 60 и 120 минут после ее введения (табл.13).

Проведенное исследование позволило установить, что наиболее высокий уровень гликемии отмечался в группе, получавшей

физиологический раствор ($14,9 \pm 0,1$; $14,1 \pm 0,2$; $13,3 \pm 0,1$ ммоль/л на 7-й, 14-й и 28-й день «терапии» соответственно) (рис.11А).

Пероральное введение всех исследуемых соединений оказывало разное по выраженности гипогликемическое действие, которое заключалось в снижении концентрации глюкозы в крови, измеряемой после 6 часов голодания (рис.11) и увеличении скорости ее утилизации при проведении ПТТГ (рис.12).

Наибольшее влияние на уровень гликемии и значительное увеличение скорости утилизации глюкозы (снижение AUC) выявлено у соединения под шифром ZB-16 (рис.11А, рис.12А). При этом гипогликемическое действие соединения ZB-16 (1 мг/кг) было сопоставимо с таковым у препаратов сравнения. Так, через 7 дней «терапии» у животных, которые перорально получали соединения ZB-16, уровень гликемии и уровень AUC были ниже, чем в контрольной группе на 15,3% и 21% соответственно, что было сопоставимо или превосходило показатели животных, получавших препарат сравнения метформин (14,1% и 10,5% соответственно). При этом гипогликемическое действие соединения ZB-16 было сопоставимо в дозах 1 и 10 мг/кг.

Из других исследуемых веществ, через 7 дней после начала терапии, значимую активность проявило только соединение ZB-17 в дозе 10 мг/кг, достоверно снижая AUC на 19,6% по сравнению с контрольной группой. В группах, получавших остальные исследуемые соединения в течение 7 дней, отмечалась лишь тенденция к снижению оцениваемых показателей.

Через 14 дней после начала лечения у животных также измерялась концентрация глюкозы натощак и скорость ее утилизации при проведении ПТТГ. Пероральное введение соединения ZB-16 во всех исследуемых дозах способствовало снижению гликемии натощак (на 5,8, 14,4 и 9,8% соответственно, относительно значений в группе СД + физиологический раствор), однако различия не достигали статистической значимости. При анализе результатов ПТТГ было отмечено, что у животных, получавших

соединения ZB-16 и ZB-18 в дозе 1 мг/кг, скорость утилизации глюкозы достоверно превосходила зарегистрированную в контрольной группе (на 29,9 и 16,7% соответственно, $p < 0,05$).

После 4 недель введения у животных, получавших соединение ZB-16, отмечалось значимое снижение уровня гликемии (соответственно на 16 и 16,6% при введении в дозах 1 и 10 мг/кг) и значения AUC (на 38 и 36,6% при введении в дозах 1 и 10 мг/кг) по сравнению с контрольной группой (рис.11А и рис.12А).

В группах, получавших метформин и ситаглиптин, по сравнению с контрольной группой, выраженное снижение уровня гликемии наблюдалось только через 28 дней введения, а значимое улучшение утилизации глюкозы – через 14 дней (рис.11Е и рис.12Е).

При анализе обобщенных графиков (рис.11Ж и рис.12Ж) отмечено, что по влиянию на уровень тощаковой гликемии и скорость утилизации глюкозы наиболее выраженным гипогликемическим действием обладает соединение ZB-16 в дозе 1 мг/кг. При этом выраженность гипогликемического действия у него была сопоставима или незначительно уступала метформину. Остальные исследуемые агонисты значимо улучшали ($p < 0,05$) утилизацию глюкозы у животных после 7 (ZB-18), 14 (ZB-18, ZB-19) и 28 (ZB-17, ZB-18 ZB-19, ZB-20) дней перорального введения.

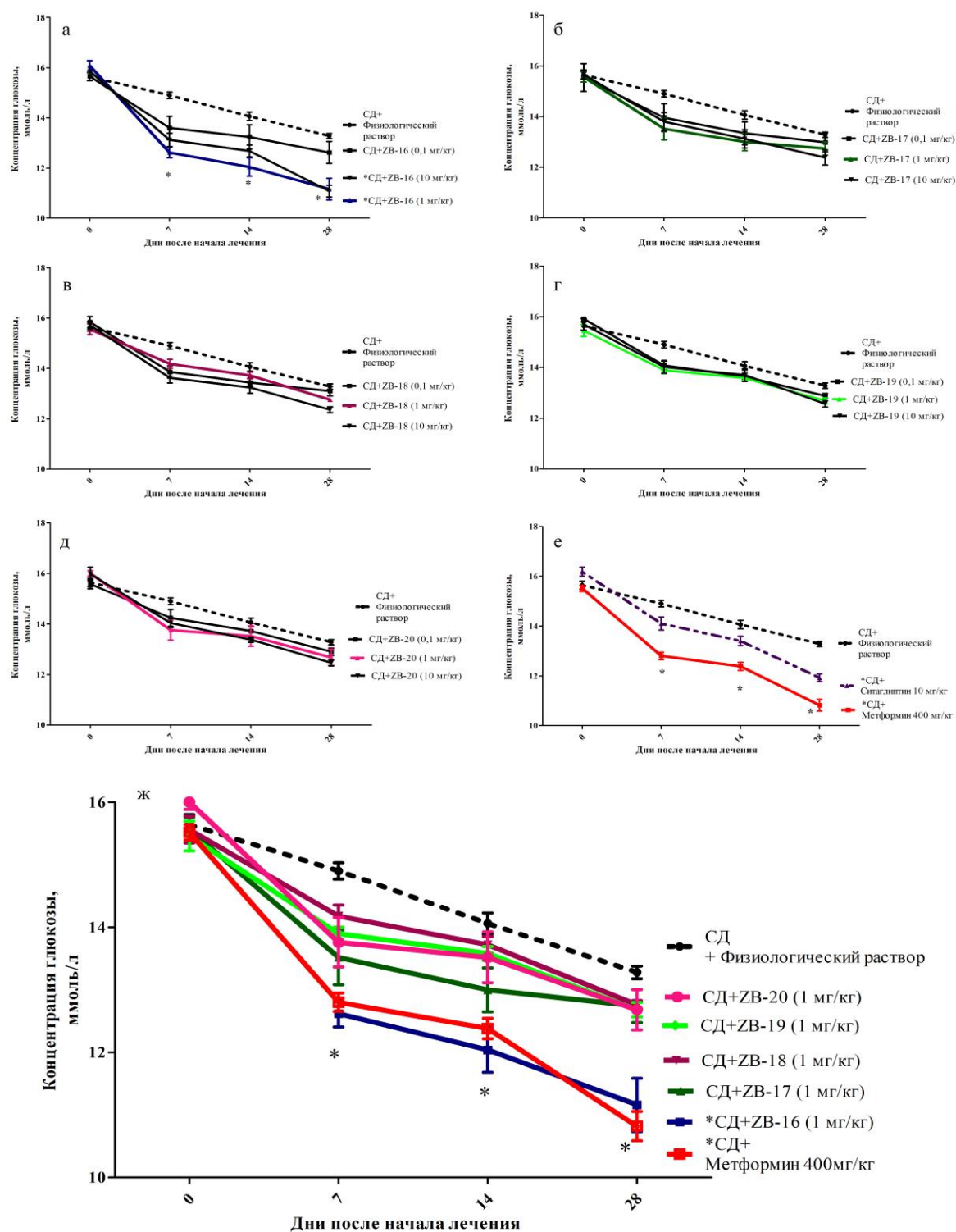


Рисунок 11. Влияние введения соединений ZB-16 (А), ZB-17 (Б), ZB-18 (В), ZB-19 (Г), ZB-20 (Д) и препаратов сравнения (Е) на уровень гликемии (ммоль/л) у животных с экспериментальным СД через 0, 7, 14 и 28 дней после начала лечения

*Примечание: * – различия достоверны по отношению к группе СД+физ.р-р ($p < 0,05$)*

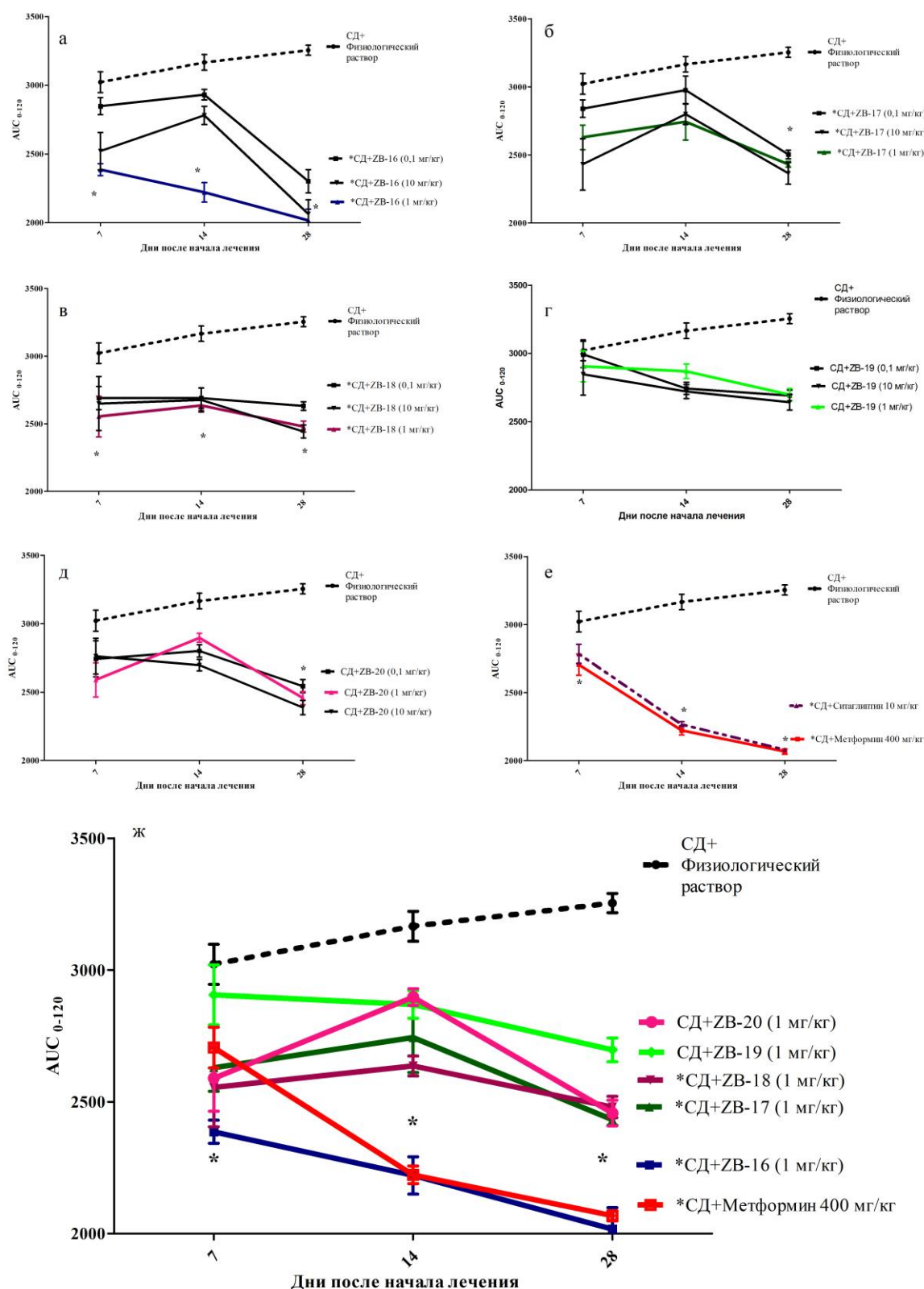


Рисунок 12. Значение площади под кривой «уровень гликемии-время» при проведении ПТТГ у животных с экспериментальным СД на 7-й, 14-й и 28-й день после начала лечения соединениями ZB-16 (А), ZB-17 (Б), ZB-18 (В), ZB-19 (Г), ZB-20 (Д) и препаратами сравнения (Е)

Примечание: * – различия достоверны по отношению к группе СД+физ.р-р ($p < 0,05$)

Таблица 13

Относительные показатели (% к контрольной группе животных СД+физ.р-р) уровня гликемии натощак и площади под кривой «концентрация глюкозы-время» при проведении ПТТГ через 7, 14 и 28 суток после начала терапии

Группа/доза	Время регистрации/Параметр					
	Через 7 суток		Через 14 суток		Через 28 суток	
	Конц. Глюкозы	AUC ₀₋₁₂₀	Конц. Глюкозы	AUC ₀₋₁₂₀	Конц. Глюкозы	AUC ₀₋₁₂₀
Значения в группе СД+физ.р-р (конц. глюкозы - ммоль/л; площадь под кривой - ммоль/л*мин)						
СД	14,9 ± 0,1	3021 ± 76	14,1 ± 0,2	3165 ± 57	13,3 ± 0,1	3253 ± 36
Относительное изменение значений, по сравнению с группой СД+физ.р-р, (%)						
СД+ЗВ-16						
0,1 мг/кг	-8,7	-5,8	-5,8	-7,4	-5,0	-29,3*
1 мг/кг	-15,3	-21,0*	-14,4	-29,9*	-16,0*	-38,0*
10 мг/кг	-11,9	-16,6*	-9,8	-12,2	-16,6*	-36,6*
СД+ЗВ-17						
0,1 мг/кг	-6,3	-6,0	-5,1	-6,0	-2,3	-23,1*
1 мг/кг	-9,3	-13,0	-7,5	-13,3	-4,1	-25,3*
10 мг/кг	-7,4	-19,6*	-6,7	-11,6	-6,8	-27,3*
СД+ЗВ-18						
0,1 мг/кг	-7,0	-11,0	-4,4	-15,0	-1,4	-19,1*
1 мг/кг	-4,8	-15,5	-2,4	-16,7*	-3,9	-23,8*
10 мг/кг	-8,6	-12,3	-5,8	-15,5	-6,9	-24,9*
СД+ЗВ-19						
0,1 мг/кг	-5,5	-1,0	-3,0	-13,3	-3,0	-17,3*
1 мг/кг	-6,7	-3,8	-3,4	-9,4	-4,5	-17,1*
10 мг/кг	-5,9	-5,8	-2,6	-14,1	-5,4	-18,8*
СД+ЗВ-20						
(0,1 мг/кг	-4,4	-9,2	-2,4	-11,5	-2,9	-21,8*
1 мг/кг	-7,7	-14,3	-3,8	-8,5	-4,5	-24,5*
10 мг/кг	-5,8	-8,6	-4,8	-14,8	-6,2	-26,6*
СД+метформин						
400 мг/кг	-14,1	-10,5	-11,9	-29,8*	-18,5*	-36,5*
СД+ситаглиптин						
10 мг/кг	-5,4	-7,8	-4,7	-28,4*	-10,2	-36,0*

Примечание. * – Различия достоверны по отношению к группе СД+физ. р-р ($p < 0,05$)

Исследование острой токсичности потенциальных лекарственных препаратов является основой в обосновании степени безопасности новых веществ, проходящих доклиническое исследование. Выяснение уровня ЛД₅₀ вещества позволяет определить класс его токсичности, а при наличии данных по терапевтической активности рассчитать терапевтический индекс, условно отражающий степень безопасности нового средства.

С учетом нормативных требований, принятых в Российской Федерации [Миронов А. Н., 2012], острую токсичность нового агониста GPR119 рецептора – соединения ZB-16 исследовали на двух видах половозрелых животных: мышах (самцах и самках массой 18-22 г) и крысах (самцах и самках массой 180–220 г). При проведении исследований использовали энтеральный (внутрижелудочно) путь введения. Исследуемую субстанцию вводили в максимально допустимых объемах растворителя мышам и крысам, с использованием атравматического металлического зонда двукратно внутрижелудочно. Для наблюдения за животным, которым было введено соединение ZB-16 в соответствующей дозе, их помещали в изолированные плексигласовые боксы 15x25x15 см. До начала эксперимента все испытуемые животные в течение 12 часов находились на пищевой депривации.

Оценка клиники токсических признаков включала в себя мониторинг:

- общего состояния, поведения: характер шерстного покрова – изменения окраса, гладкости, плотности, опрятности; слизистых оболочек – окраска, отечность, наличие и характер выделений; подвижность; масса тела;
- параметров нервно-мышечной возбудимости: рефлекторные реакции на внешние раздражители – звуковые (постукивание по клетке), тактильные (прикосновения к коже), болевые (раздражение острой иглой различных участков кожи и сдавливание кончика хвоста), изменения положения тела (прострация, скованность), положение конечностей, наличие судорог, парезов, тремора, подергиваний;

- вегетотропных реакций: реакции зрачка, цвет кожи, наличие уринаций, дефекаций, саливаций.

По окончании 14-дневного периода наблюдения была произведена некропсия.

3.3 Изучение острой токсичности агониста GRP-119 рецептора на мышах

В проведенном исследовании на мышах, которым вводилось соединение ZB-16 в дозах 500; 1000 и 2000 мг/кг двукратно, внутрижелудочно (плохо растворимые дозы в максимально допустимых [Миронов А.Н., 2012] объемах растворителя – дистиллированной воды), случаев смерти не отмечалось, а в общем состоянии и поведении наблюдались признаки слабой седации, снижения подвижности, угнетения реакций на тактильные раздражители. Данные изменения в поведении и общем состоянии мышей были отмечены у животных, которым вводили исследуемое соединение в дозах 1000 и 2000 мг/кг, и отсутствовало у мышей, которым вводили ZB-16 в дозе 500 мг/кг. При внешнем осмотре мышей – шерстной покров и слизистые оболочки, а также кожные покровы не различалось с таковым контрольной группы. По окончании первых суток наблюдений общее состояние данных животных, их двигательное поведение и нервно-мышечные реакции приближались к таковым у контрольной группы. В дальнейшем (в течение 2-недельных наблюдений) у этих животных также не были отмечены какие-либо различия с контрольными мышами. При вскрытии животных на 14-е сутки эксперимента не обнаружено наличия субстанции соединения ZB-26 на всем протяжении кишечника, при этом на слизистой желудка и кишечника не были выявлены кровоизлияния и эрозия. При осмотре видимых слизистых (оболочки глаз, ротовая полость) и кожных покровов также не было обнаружено признаков сыпи, гиперемии и эффектов, указывающих на раздражающее действие (отек,

набухание, локальное расширение сосудов и пр.). Не выявлено также каких-либо изменений и в паренхиматозных органах.

При анализ динамики изменений массы тела мышей (табл.14), потреблением воды и пищи достоверно значимых различий между группами контрольных и опытных групп не установлено. Также не было выявлено различий в реакции на введение вещества ZB-16 внутрижелудочно у животных разного пола.

Таблица 14

Масса тела мышей (гр, $M \pm m$), получавших внутрижелудочно в токсических дозах соединение ZB-16

Варианты исследований	Пол	Периодичность измерений		
		Исход	7 дней (прирост в %)	14 дней (прирост в %)
Контроль (дис. вода)	Самцы	20±0,8	20±0,5 (0%)	20,3±0,3 (1,7%)
	Самки	19,2±0,5	19,7±0,7 (2,6%)	20,2±0,4 (5,2%)
ZB-16, 500 мг/кг	Самцы	21±0,5	20,3±0,7 (-3,2%)	21,5±0,5 (2,4%)
	Самки	21,2±0,7	20,7±0,7 (-2,4%)	22±0,7 (3,9%)
ZB-16, 1000 мг/кг	Самцы	20,7±0,8	19,7±0,4 (-4,8%)	21,2±0,8 (2,4%)
	Самки	20,5±0,7	20±0,3 (-2,4%)	21,2±0,3 (3,3%)
ZB-16, 2000 мг/кг	Самцы	20±0,7	18,8±0,3 (-5,8%)	20,8±0,6 (4,2%)
	Самки	19,8±0,4	19,2±0,5 (-3,3%)	21±0,7 (5,8%)

В связи с отсутствием гибели мышей, которым исследуемое соединение вводилось внутрижелудочно в максимальной дозе 2000 мг/кг (практически нерастворимая доза вещества в максимально допустимых объемах растворителя), границы ЛД₅₀ соединения ZB-16 были приняты условно и составили более 2000 мг/кг.

Таблица 15

Гибель мышей в экспериментах по изучению острой токсичности соединения ZB-16 (внутрижелудочный путь)

Доза мг/кг	Самцы n/N	Доза мг/кг	Самки n/N
500,0	0/8	500,0	0/8
1000,0	0/8	1000,0	0/8
2000,0	0/8	2000,0	0/8

Примечание. Группа контрольных животных в таблицу не внесена; n – количество погибших мышей; N – количество животных в группе

3.4 Изучение острой токсичности агониста GRP-119 рецептора на крысах

Проведенное исследование позволило установить, что внутрижелудочное введение крысам соединения ZB-16 в дозах 500; 1000 и 2000 мг/кг (максимально растворимые дозы, в рекомендуемом максимально допустимом объеме растворителя – 50 мл/кг, который вводился животным дробно двукратно по 2,5 мл на 100 г) не вызывает гибели в ранние и отдаленные периоды наблюдений. При этом клиника токсических эффектов проявлялась в виде снижения двигательной активности (отсутствие перебежек и перемещений по камере наблюдений), снижении реакций на внешние раздражители (тактильные, слуховые и болевые), незначительной седации и мышечной релаксации. Зрачковый рефлекс, дефекации не изменялись. Со стороны вегетотропных реакций у животных опытных групп отмечено углубление дыхания, при этом ритмичность дыхания не нарушалась. При осмотре состояния шерстного покрова, видимых слизистых и кожных покровов различий с контрольной группой не выявлено. Указанное состояние у крыс, получавших соединения ZB-16 в дозе 500 мг/кг прослеживалось в течение 4-6 часов, а у крыс, получавших в дозах 1000 и 2000 мг/кг наблюдалось до окончания первых суток. Начиная со вторых

суток наблюдения, общее состояние опытных групп крыс практически соответствовало контролю. Шерстный покров у опытных животных был гладкий, ухоженный, белый и блестящий, слизистые – чистые, на кожных покровах отсутствовали признаки гиперемии и отечности. При этом акты уринаций и дефекаций у крыс в опытных группах соответствовали контрольной группе.

Результаты вскрытия животных, проведенного по окончании 14-ти дневного наблюдения, не позволили зафиксировать патологических изменений в расположении внутренних органов, их структуре и окраске.

Динамика изменений массы тела у опытных и контрольных крыс, регистрируемая на 7-й и 14-й дни эксперимента, представлена в табл.16. Из приведенных данных следует наличие положительного прироста массы тела к концу периода наблюдения во всех испытуемых группах без достоверных значимых различий в исследуемых группах контроль и опыт, а также между самцами и самками.

С учетом отсутствия гибели особей в группах крыс, получавших исследуемое соединение, границы ЛД₅₀ ZB-16 были рассчитаны ориентировочно по максимально введенной дозе в соответствии с рекомендациями [Миронов А.Н., 2012; Саноцкий И.В., 1970]. На основании этого было определено, что ЛД₅₀ соединения ZB-16 при внутрижелудочном введении половозрелым крысам обоего пола ориентировочно составляет 2000 мг/кг.

Таблица 16

Масса тела крыс (г, $M \pm m$), получавших (внутрижелудочно) в токсической дозе соединение ZB-16

Варианты исследований	Пол	Периодичность измерений		
		Исход	7 дней (прирост в %)	14 дней (прирост в %)
Контроль (дист.вода)	Самцы	206,3±2,2	211,2±1,3 (2,3%)	217,5±1,1 (5,4%)
	Самки	204,7±1,8	209,8±1,1 (2,5%)	216,2±2 (5,6%)
ZB-16, 500 мг/кг	Самцы	212,8±3,4	211±3,3 (-1%)	221,5±2,5 (4,1%)
	Самки	209,2±2,7	211,7±1,8 (1,2%)	218,7±2,8 (4,5%)
ZB-16, 1000 мг/кг	Самцы	211,5±2,4	207±2,7 (-2,1%)	218,8±2,5 (3,5%)
	Самки	213,7±2,4	208,8±2,1 (-2,3%)	220±2,2 (3%)
ZB-16, 2000 мг/кг	Самцы	210,5±1,9	204,3±2,8 (-2,9%)	218,3±1,7 (3,7%)
	Самки	208,5±1,6	202,7±2,7 (-2,8%)	216,8±2,2 (4%)

3.5 Заключение

В ходе выполненного исследования были ресинтезированы несколько серий соединений на основании данных химических библиотек. Все они протестированы на наличие агонистической активности к GPR119, а также оценены их базовые фармакокинетические свойства. Однако в результате ни одно синтезированное таким образом соединение не было признано удовлетворяющим требуемым характеристикам.

После анализа строения молекул, зарегистрированных в клинических испытаниях в качестве агонистов GPR119, была синтезирована новая серия веществ, среди которых, посредством изменения структуры исходной молекулы, удалось создать несколько соединений, удовлетворяющих основным целевым требованиям (уровню агонистической активности, лекарственной безопасности, базовым фармакокинетическим и

фармакодинамическим характеристикам). В результате, была произведена последующая оптимизация структуры исходной молекулы, после чего требуемые параметры вышли на уровни с приемлемыми фармакологическими свойствами.

Установлено, что в ряду исследуемых агонистов GPR119 при однократном введении интактным животным и курсовом введении животным со никотинамид-стрептозотоцин-индуцированным СД, наиболее выраженное гипогликемическое действие оказывает ZB-16 в дозе 1 мг/кг. У животных, получавших данное соединение, отмечалось значимое снижение уровня гликемии после 6 ч голодания и площади под кривой «уровень гликемии-время» (при проведении ПТТГ), что говорит о нормализации уровня тощачковой гликемии и повышении скорости утилизации глюкозы на фоне курсового введения ZB-16.

Введение соединения ZB-16, вероятно оказывает не только гипогликемическое действие, но и способно ускорять регресс никотинамид-стрептозотоцин-индуцированного СД, поскольку через 7 дней после начала терапии у животных отмечалась достоверная разница в уровне гликемии и скорости утилизации глюкозы, что, возможно, связано с процессами, способствующими восстановлению массы и/или функционирования β -клеток. Подобное действие агонистов GPR119 было описано в ряду недавних исследований [Ansarullah P.D., 2016]. В литературе также широко описаны глюкозозависимые эффекты ГПП-1, направленные на поддержание жизнеспособности β -клеток, снижение аппетита, коррекцию и восстановление функционирования сердечно-сосудистой системы (эндотелиопозитивное и кардиопозитивное действие) [Аметов А.С., 2014; Спасов А.А., 2015; Шестакова М.В., 2012].

На основании сравнительного анализа параметров всасывания, распределения, метаболизма и выведения, а также данных по исследованию активности в *in vitro* и *in vivo* в качестве перспективного было выбрано соединение под лабораторным шифром ZB-16.

По результатам проведенного исследования острой токсичности можно заключить, что соединение ZB-16 при внутрижелудочном введении мышам и крысам обоего пола является малотоксичным. В клинике отравления отмечены элементы слабовыраженной седации ЦНС, снижение двигательной активности, угнетение подвижности и нервномышечных реакций на тактильные и болевые раздражители. Данные эффекты были непродолжительными и восстанавливались до уровня контрольных значений в течение первых дней наблюдений. При этом гибели животных в течение 2-недельного наблюдения не фиксировалось. В связи с отсутствием ранней и отдаленной гибели животных в опытных группах уровни границ ЛД₅₀ для внутрижелудочного введения соединения ZB-16 были определены ориентировочно (табл.17).

Таблица 17

Величины острой токсичности при внутрижелудочном введении соединения ZB-16

Животные	ЛД ₅₀ , мг/кг
<i>Мыши:</i> Самцы Самки	Более 2000 мг/кг
<i>Крысы:</i> Самцы Самки	Более 2000 мг/кг

Из результатов, представленных в разделах 3.3 и 3.4, следует, что границы ЛД₅₀ соединения ZB-16 составляют: в опытах на половозрелых мышах – более 2000 мг/кг при внутрижелудочном введении; в опытах на половозрелых крысах – более 2000 мг/кг при внутрижелудочном введении, что с учетом классификации токсичности позволяет отнести соединение ZB-16 к классу малотоксичных средств.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АГОНИСТА GPR119 НА ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ СД

После скринирования соединений, проявляющих агонистическую активность в отношении GPR119, на выраженность гипогликемического действия и выявления соединения лидера, а также установления параметров лекарственной безопасности, его противодиабетический потенциал был подтвержден в нескольких независимых экспериментальных сериях, проведенных на большем (чем в скрининговых исследованиях) количестве животных.

Поскольку гипогликемические лекарственные средства редко применяются в монотерапии, что связано с ее недостаточной эффективностью вследствие гетерогенности этиологии и патогенеза, а также прогрессирования СД у каждого пациента, возникает необходимость оценки эффективности применения разрабатываемого соединения в составе комбинированной терапии. Гипогликемическая активность соединения ZB-16, а также его комбинации с существующими противодиабетическими препаратами оценивалась на модели никотинамид-стрептозотоцин-индуцированного СД при его 4-недельном пероральном введении. На первом этапе был проведен рескрининг гипогликемической активности соединения ZB-16 при его пероральном введении в сравнении с референтным препаратом – ситаглиптином. Затем, в 2 независимых экспериментальных сериях, на модели никотинамид-стрептозотоцин-индуцированного СД эффективность 4-недельного перорального введения соединения ZB-16 сравнивалась с аналогичным введением его комбинации с метформином или ситаглиптином. На следующем этапе исследования была оценена эффективность использования соединения ZB-16 в дозах 0,1 и 1 мг/кг в комбинации с препаратом метформин, при этом доза метформина была постоянной и составляла 400 мг/кг. Данная серия проводилась с целью экспериментального

обоснования целесообразности сочетанного применения соединения ZB-16 и метформина в 2 режимах дозирования агониста, поскольку, с одной стороны, это экономически оправдано, что найдет отражение в таком качестве лекарственного препарата, как доступность (экономическая), а с другой – позволяет снизить частоту или выраженность возможных нежелательных реакций без существенной потери в эффективности. Результаты исследования представлены ниже.

4.1 Гипогликемическое действие агониста GPR119 на модели никотинамид-стрептозотоцин-индуцированного СД^{††}

До моделирования, стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД все животные были сопоставимы по начальному уровню глюкозы в крови, измеренной после 6-часового голодания, а животные в интактной группе на протяжении всего эксперимента были здоровыми, о чем свидетельствуют результаты измерений концентрации глюкозы и периодического проведения ПТТГ. Однократное внутрибрюшинное введение стрептозотоцина на фоне предварительно введенного никотинамида приводило к развитию гипергликемии у всех экспериментальных животных. После выбраковки животных, концентрация глюкозы в крови которых не отвечала требуемому уровню, были сформированы экспериментальные группы с сопоставимым значением «тощаковой гликемии». Непосредственно перед началом терапии всем животным был проведен ПТТГ и построена кривая зависимости концентрации глюкозы в крови от времени, а затем определено значение площади под этой кривой. По результатам теста все экспериментальные группы до начала лечения характеризовались тяжелыми нарушениями метаболизма углеводов, что выражалось в снижении скорости утилизации глюкозы по отношению к интактной группе. Ежедневное пероральное

^{††} Исследование выполнено совместно с к.м.н. Д.А. Бакулиным, Е.О. Логвиновой.

введение различных доз соединения ZB-16 и ситаглиптина в разной степени приводило к снижению уровня гликемии натощак и повышению скорости утилизации глюкозы при проведении ПТТГ.

При двухфакторном дисперсионном анализе изменения концентрации глюкозы натощак во всех временных точках было установлено статистически значимое влияние следующих факторов: «время» $F(5, 140) = 128,2$, $p < 0,0001$; «терапия» $F(4, 28) = 99,12$, $p < 0,0001$ и их взаимодействие $F(28, 140) = 1,438$, $p < 0,0001$.

Дальнейшее сравнение результатов терапии проводили относительно группы животных с экспериментальным СД, не получавших лечения, для чего применялся пост-хок теста Даннета. Достоверно значимые различия в концентрации глюкозы в крови при измерении натощак фиксировались в отношении животных с экспериментальным СД, не получавших «лечение», начиная с 21-го дня «терапии», и сохранялись до окончания наблюдения за животными (на 28-й день «терапии»).

В исследовании помимо концентрации глюкозы определяли скорость ее утилизации с определением площади под кривой концентрация глюкозы. Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что на этот показатель статистически значимо влияли несколько факторов: «время» $F(1, 28) = 158,7$, $p < 0,0001$; «терапия» $F(4, 28) = 13,27$, $p < 0,0001$; и их взаимодействие $F(28, 28) = 0,6807$. При сравнении результатов 4-недельного введения соединения ZB-16 в обеих дозах и препарата ситаглиптин отмечалось, что скорость утилизации глюкозы в этих группах была статистически значимо выше (на 17,7; 23,5 и 31,2%), чем у контрольных животных, не получавших «лечения», и показателей этих же животных, но зафиксированных до начала лечения (на 35,4; 37,7 и 46%). Основные результаты данного этапа исследования отражены на рис.13, более подробная информация представлена в таблице (Приложение 4). На рис.13А не представлены обозначения статистической значимости различий между группами, поскольку это будет перегружать

рисунок и не поможет облегчить представление данного блока результатов исследования.

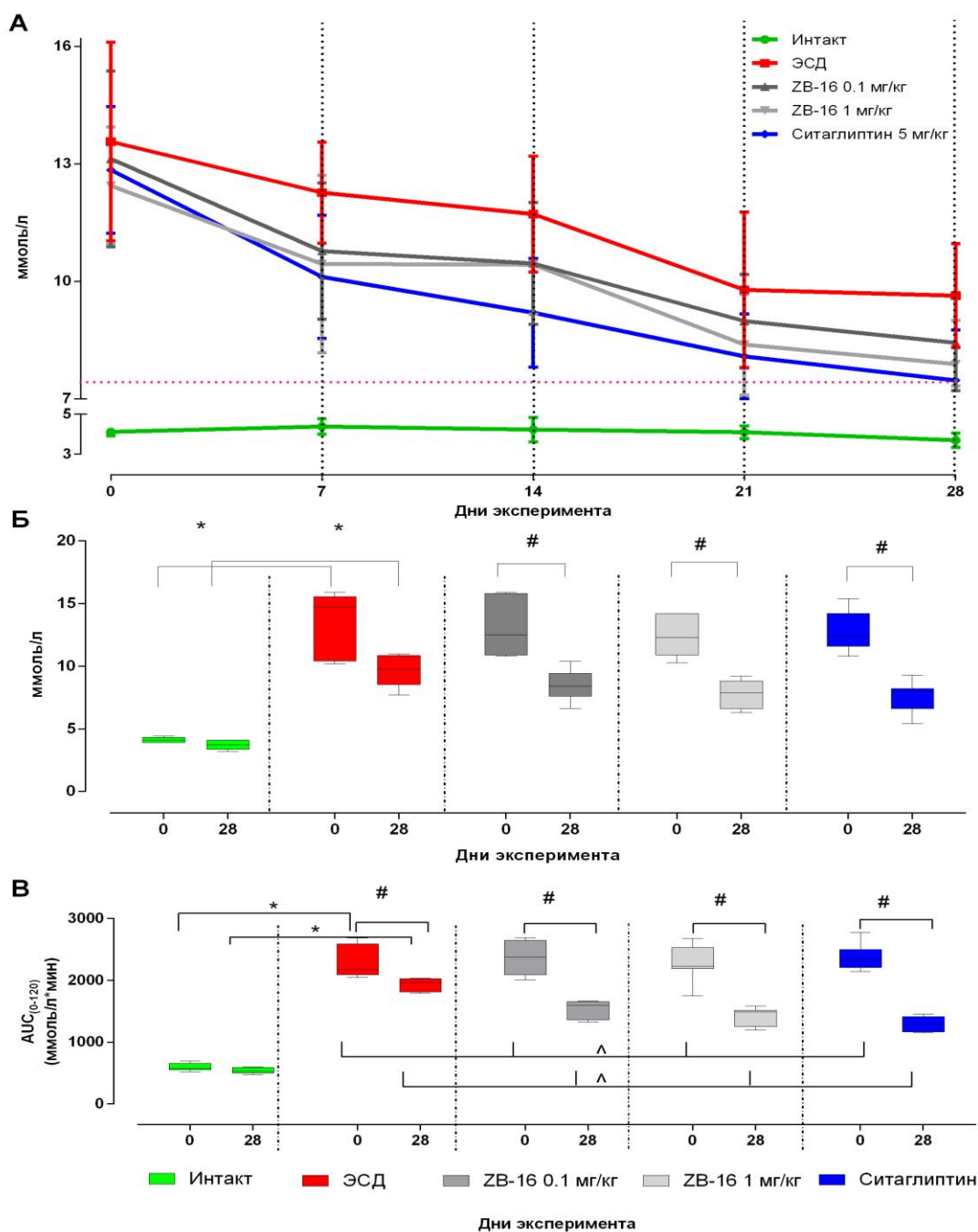


Рисунок 13. Изменение концентрации глюкозы на протяжении всего периода лечения (А), до и через 4 недели «лечения» (Б), а также результаты ПТТГ до и после «лечения» (В)

Обозначения: * - различия достоверны по отношению к группе интакт; # - различия до и после лечения достоверны; ^ - различия достоверны по отношению к группе ЭСД; пост-хок теста Даннета

Таким образом, данный этап исследования показал, что ежедневное пероральное введение нового агониста GPR119 – соединения ZB-16 в дозах 0,1 и 1 мг/кг сопоставимо с ситаглиптином снижает концентрацию глюкозы в крови, измеренную натощак, и повышает скорость ее утилизации при проведении ПТТГ на сопоставимом с референтным препаратом уровне.

4.2 Гипогликемическое действие агониста GPR119 и его комбинаций с ситаглиптином или метформином на модели экспериментального СД

На следующем этапе проведено сравнение эффективности гипогликемического действия нового агониста GPR119 с референтными препаратами и его комбинациями с ними. В качестве референтных препаратов использовали метформин в дозе 400 мг/кг и ситаглиптин в дозе 5 мг/кг. Доза вводимого агониста (соединения ZB-16) при моно- и комбинированной терапии была одинаковой и составляла 1 мг/кг, поскольку на этапах скрининга и рескрининга она была более эффективной. Как и на предыдущих этапах, гипогликемическое действие изучали на животных с экспериментальным СД, которым до начала лечения определили концентрацию глюкозы в крови (после 6-часового голодания), что и легло в основу формирования исследуемых групп. Экспериментальные группы до лечения были сопоставимы по тяжести ЭСД, о чем свидетельствуют практически одинаковые концентрации глюкозы в крови, измеренной натощак (рис.14).

Для оценки влияния изучаемых веществ на уровни глюкозы измеряли ее плазменные концентрации у животных до моделирования ЭСД (-3 день на рис.14А), до (0 день рис.14А) через 7, 14, 21 и 28 дней после начала терапии (рис.14А). При двухфакторном дисперсионном анализе полученных результатов было установлено, что статистически значимое влияние на исследуемый показатель оказывали следующие факторы: «время» (F (5, 670)

= 437,0; $p < 0,0001$), «терапия» ($F(6, 134) = 9,975$; $p < 0,0001$), а также взаимодействие данных факторов ($F(30, 670) = 8,445$; $p < 0,0001$). Дальнейшее сравнение результатов терапии проводили относительно группы животных с экспериментальным СД, не получавших «лечения», для чего применялся пост-хок тест Даннета. Было установлено, что в группах ZB-16 и ZB-16+Метформин статистически значимые различия в концентрации глюкозы «натощак» появлялись уже на 7 сутки после начала «терапии» ($p < 0,05$).

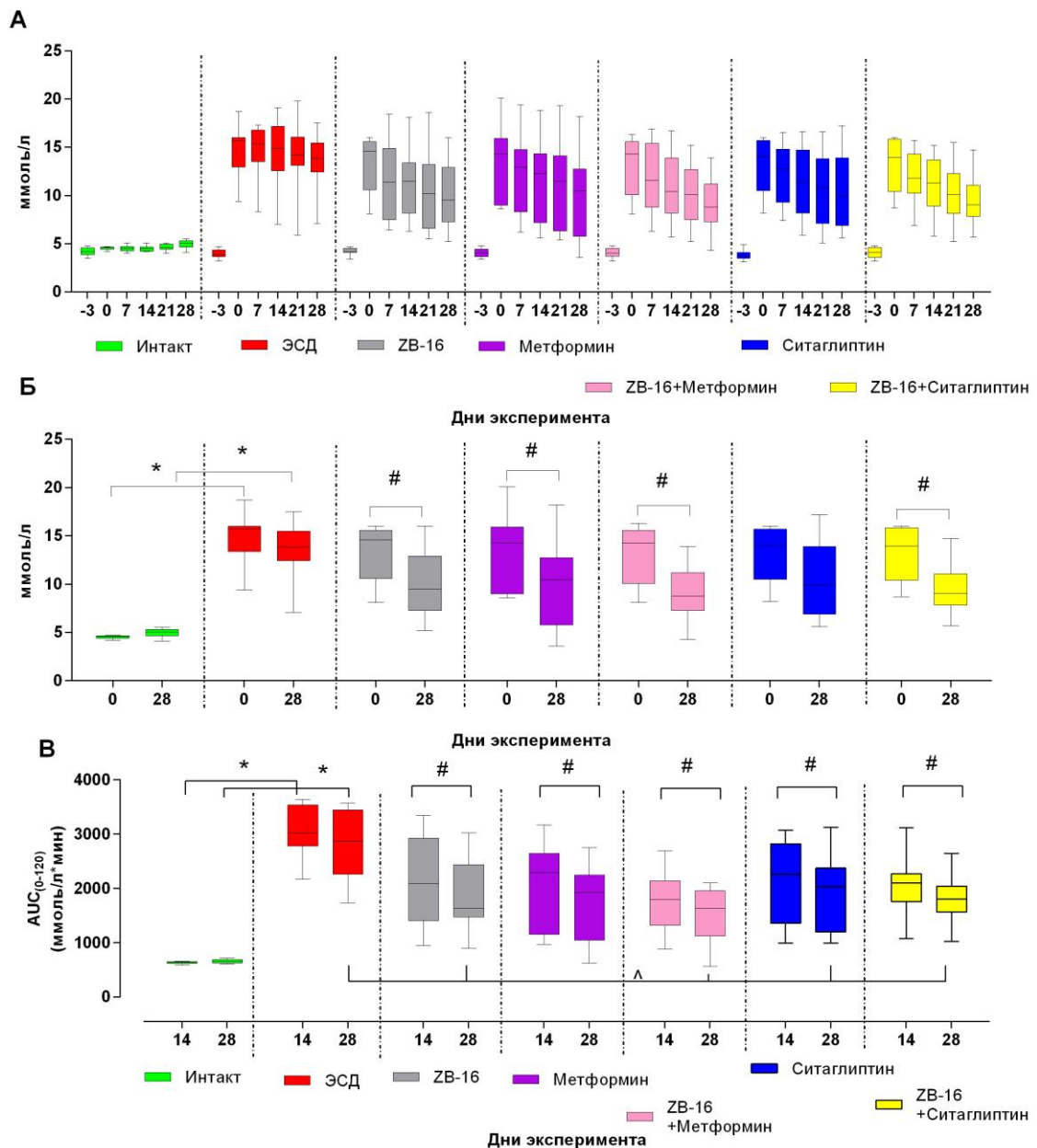


Рисунок 14. Изменение концентрации глюкозы на протяжении всего периода «лечения» (А), до и через 4 недели лечения (Б), а также результаты ПТТГ через 14 и 28 дней лечения (В)

Через 7 дней после моделирования экспериментального СД в группе животных, не получавших «лечение», концентрация глюкозы в крови, измеренная после 6-часового голодания, превышала значения, зафиксированные до введения стрептозотоцина, почти в три раза и составляла в среднем $14,6 \pm 0,6$ ммоль/л. Ежедневное пероральное введение животным соединения ZB-16 и его комбинации с метформином, очевидно, улучшало состояние животных, поскольку концентрация глюкозы в их крови была статистически значимо ниже ($p < 0,05$), чем у не получавших «лечения» и составляла в среднем $12,3 \pm 0,8$ и $12,2 \pm 0,7$ ммоль/л. В остальных экспериментальных группах значения данного показателя были меньше, чем в контрольной группе, но эти различия были не достоверны.

При измерении тощачовой концентрации глюкозы у экспериментальных животных через 14 дней после начала «терапии» было отмечено, что данный показатель практически не изменился у животных, которые не получали «лечения», и составил в среднем $14,3 \pm 0,6$ ммоль/л. В то же время во всех остальных группах концентрация глюкозы в крови была ниже, чем в контрольной, и данные различия были достоверны. Так, в группе животных, которые в течение двух недель получали соединение ZB-16, его комбинацию с метформином и ситаглиптином, а также референтные препараты по отдельности, концентрация глюкозы, измеренная натощак, составила в среднем $12 \pm 0,9$; $10,9 \pm 0,7$; $11,3 \pm 0,5$; $11,7 \pm 0,8$; $11,8 \pm 0,6$ ммоль/л соответственно. При этом комбинированное введение, по влиянию на уровень глюкозы, измеренной натощак, было наиболее эффективно, что указывает на потенцирование гипогликемических эффектов метформина и ситаглиптина агонистом GPR119. Помимо измерения концентрации глюкозы после 6-часового голодания через 2 недели после начала «терапии» был проведен ПТТГ, в результате которого было отмечено, что у животных,

получавших «лечение» соединением ZB-16, его комбинациями или референтными препаратами по отдельности, скорость утилизации глюкозы была выше и достоверно отличалась от значений контрольной группы. Минимальное значение площади под кривой «концентрация глюкозы-время» было отмечено у животных, перорально получавших комбинацию ZB-16 и метформина, которое составило в среднем $1784,5 \pm 113,4$ ммоль/л*мин, что на 40,5% было меньше, чем в группе, не получавшей «лечение». Другие варианты терапии также оказали значимое влияние на скорость утилизации глюкозы, но в несколько меньшей. Так, пероральное введение метформина сокращало площадь под кривой «концентрация глюкозы-время» на 32% ($2038,0 \pm 151,2$ ммоль/л*мин), комбинация ZB-16 с ситаглиптином на 30,8% ($2075,2 \pm 10,4$ ммоль/л*мин), ZB-16 на 25,7% ($2227,0 \pm 164,7$ ммоль/л*мин), а ситаглиптина на 25% ($2246,5 \pm 130,9$ ммоль/л*мин).

Дальнейшее наблюдение за экспериментальными животными показало, что через 3 недели после инициирования экспериментального СД и начала «терапии» различия в тощачовой концентрации глюкозы в крови становились более значимыми, что показывает эффективность проводимой терапии. Так, концентрация глюкозы в крови у животных, не получавших «лечение», лишь на 5% была ниже, чем в период формирования экспериментальных групп. В то же время у животных, которые получали соединение ZB-16, метформин, ситаглиптин и их комбинации с ZB-16, концентрация глюкозы в крови, измеренная после 6-часового голодания была ниже на 19,4; 19,2; 18,7; 25 и 23,2% соответственно, что указывает на эффективность монотерапии и на потенцирование эффектов гипогликемических средств, при их комбинированном введении.

Через 4 недели «терапии» экспериментального СД минимальные значения концентрации глюкозы натощак фиксировались в группе, получавшей комбинацию ZB-16 с метформином ($9,2 \pm 0,6$ ммоль/л) или ситаглиптином ($9,5 \pm 0,5$ ммоль/л), что было на 32,2 и 29,3% меньше, чем у животных, не получавших «лечения». В группах, получавших монотерапию,

концентрация глюкозы, измеренная натощак, также достоверно отличалась от значений группы с экспериментальным СД без «лечения». Так, в группе ZB-16 этот показатель в среднем составлял $9,9 \pm 0,7$ ммоль/л, метформин – $9,7 \pm 0,9$ ммоль/л, ситаглиптин – $10,7 \pm 0,8$ ммоль/л, что на 25,5; 27,2 и 20,6% меньше, чем в контрольной группе. Скорость утилизации глюкозы при проведении ПТТГ также была значительно лучше в группах, получавших комбинированную терапию, о чем свидетельствует показатель площади под кривой «концентрация глюкозы-время». В группе, животные которой в течение 4 недель получали соединение ZB-16 с метформином, этот показатель составил $1502,4 \pm 100,2$, а с ситаглиптином – $1785,5 \pm 97,2$ ммоль/л*мин, что было меньше, чем в группе без «лечения» на 45,6 и 35,4%. В то же время в группах, получавших соединение ZB-16, метформин и ситаглиптин по отдельности, площадь под кривой «концентрация глюкозы-время» составила $1831,9 \pm 138,7$; $1706,7 \pm 146,1$; $1915,8 \pm 125,3$ ммоль/л*мин соответственно, что было ниже значений контрольной группы без «лечения» на 33,7; 38,3 и 30,7% соответственно.

Необходимо отметить, что достоверные различия в значениях концентрации глюкозы, измеренной натощак и скорости ее утилизации при проведении ПТТГ были статистически значимы не только в отношении контрольной группы, но и при их сравнении «до – после» лечения (рис.14Б), а также на 14 и 28 день терапии (рис.14В).

Таким образом, данный этап экспериментального исследования подтверждает эффективность гипогликемической терапии новым агонистом GPR119 – соединением ZB-16, а также показывает возможность ее увеличения при комбинировании этого вещества с иДПП-4 – ситаглиптином и бигуанидом – метформином.

Результаты описанного выше этапа были подтверждены данными, полученными в аналогичной серии экспериментов. На модели никотинамид-стрептозотоцин-индуцированного СД соединение ZB-16, метформин, ситаглиптин и их комбинации вводились перорально в течение 4 недель. При

двухфакторном дисперсионном анализе полученных результатов было отмечено, что на концентрацию глюкозы в крови экспериментальных животных достоверно влияли фактор времени ($F(2, 152) = 101,5; p < 0,0001$), проводимая терапия ($F(7, 76) = 4,297; p < 0,0001$) и их комбинация ($F(14, 152) = 2,571; p = 0,0024$). На показатель скорости утилизации глюкозы при проведении ПТТГ также достоверно влияли фактор времени ($F(1, 76) = 7,045; p = 0,0097$) и проводимая терапия ($F(7, 76) = 6,246; p < 0,0001$). Последующий сравнительный анализ пост-хок тестом Сидак показал, что достоверные различия с группой ЭСД по показателю AUC были выявлены через 14 дней терапии с группой, получавшей комбинации ZB-16 и метформина, метформина и ситаглиптина, а через 28 дней лечения с группами, получавшими указанные комбинации, а также метформин и ZB-16 по отдельности ($p < 0,05$). Так, через 4 недели терапии скорость утилизации глюкозы при проведении ПТТГ в группе, получавшей соединения ZB-16, на 31,7% выше, чем в группе с ЭСД, не получавших лечение, а концентрация глюкозы в крови уменьшилась в среднем на 50% от значений, зафиксированных до начала лечения ($p < 0,05$). Пероральное введение метформина и ситаглиптина также значительно повышало скорость утилизации глюкозы на 40,8 и 36% относительно группы с ЭСД соответственно, а также ее концентрацию, измеренную натощак, на 53,4 и 47,5% относительно значений, зафиксированных до начала их введения ($p < 0,05$). Комбинированное введение обозначенных выше соединения ZB-16, препаратов метформин и ситаглиптин более выраженно компенсировало нарушения углеводного обмена. Так, у животных, получавших комбинацию агониста GPR119 и метформина, AUC была ниже на 52,1%, чем в группе с ЭСД, а концентрация глюкозы в крови была меньше на 55,6% ($p < 0,05$). У животных, которые получали комбинацию двух референтных препаратов (метформина и ситаглиптина), AUC была ниже, чем в контрольной на 52,5%, а концентрация глюкозы, измеренная натощак, на 56,7% ($p < 0,05$). Пероральное введение ситаглиптина и ZB-16 по влиянию на показатель AUC

и концентрацию глюкозы, измеренную натощак, практически не отличалось от оказываемого только ZB-16. Так, у животных, получавших данную комбинацию, AUC (Рисунок 15) отличался от зафиксированного в группе ЭСД только на 31,8%, а концентрация глюкозы, измеренная натощак, отличалась от начальных значений на 46,6% ($p < 0,05$).

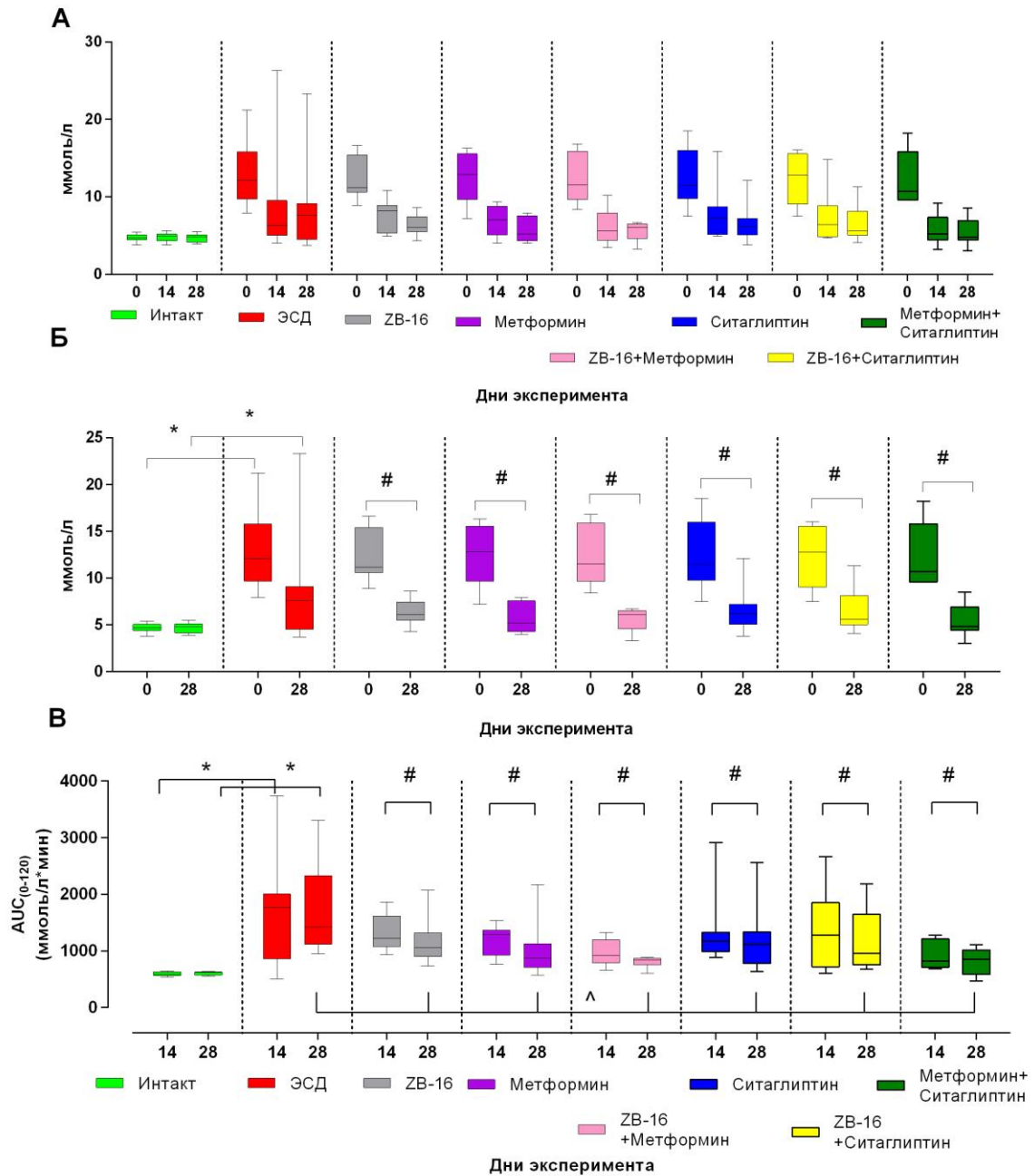


Рисунок 15. Изменение концентрации глюкозы на протяжении всего периода лечения (А), до и через 4 недели лечения (Б), а также результаты ПТТГ через 14 и 28 дней лечения (В)

4.3 Гипогликемическое действие различных доз агониста GPR119 в комбинации с метформином на модели экспериментального СД

В предыдущих этапах исследования показано выраженное гипогликемическое действие нового агониста GPR119 – соединения ZB-16 и его комбинаций с метформином и ситаглиптином. С учетом результатов исследования зависимости гипогликемического действия соединения ZB-16 от дозы (введение 0,1 мг/кг уступало по эффективности дозе 1 мг/кг) и наличия выраженного потенцирования гипогликемического действия метформином, на данном этапе было решено оценить гипогликемическое действие соединения ZB-16 в дозах 0,1 и 1 мг/кг при его комбинировании с метформином, взятым в дозе 400 мг/кг.

До начала терапии все животные, которым был смоделирован экспериментальный СД, были сопоставимы по выраженности нарушений углеводного обмена, о чем свидетельствует более чем 4-кратное увеличение концентрации глюкозы в крови, измеренной после 6-часового голодания, а также снижение скорости ее утилизации при проведении ПТТГ.

Двухфакторный дисперсионный анализ полученных данных, показал, что на изменение концентрации глюкозы, измеренной натощак, и скорость ее утилизации при проведении ПТТГ значимо влияли: фактор времени ($F(5, 170) = 782,1$; $F(2, 68) = 600,2$, соотв.), проводимая терапия ($F(5, 34) = 247,1$; $F(5, 34) = 681,7$, соотв.) и их комбинация ($F(25, 170) = 32,56$; $F(10, 68) = 32,25$, соответственно).

Сравнение концентраций глюкозы в крови животных с экспериментальным СД, которые не получали «лечение», с теми, кому перорально вводили соединение ZB-16 (в обеих дозах), метформин и их комбинации, пост-хок тестом Даннета показало, что достоверными различия были только спустя 28 дней лечения. При сравнении результатов на более

ранних контрольных точках проводимой терапии была обнаружена только тенденция снижения концентрации глюкозы, измеренной натощак, в отличие от показателей группы без «лечения». Необходимо отметить, что максимально выражено этот показатель через 28 дней «терапии» отличался от значений животных с экспериментальным СД в группах, получавших комбинированную терапию, при этом различия были сопоставимы вне зависимости от дозы, в которой соединение ZB-16 входило в комбинацию.

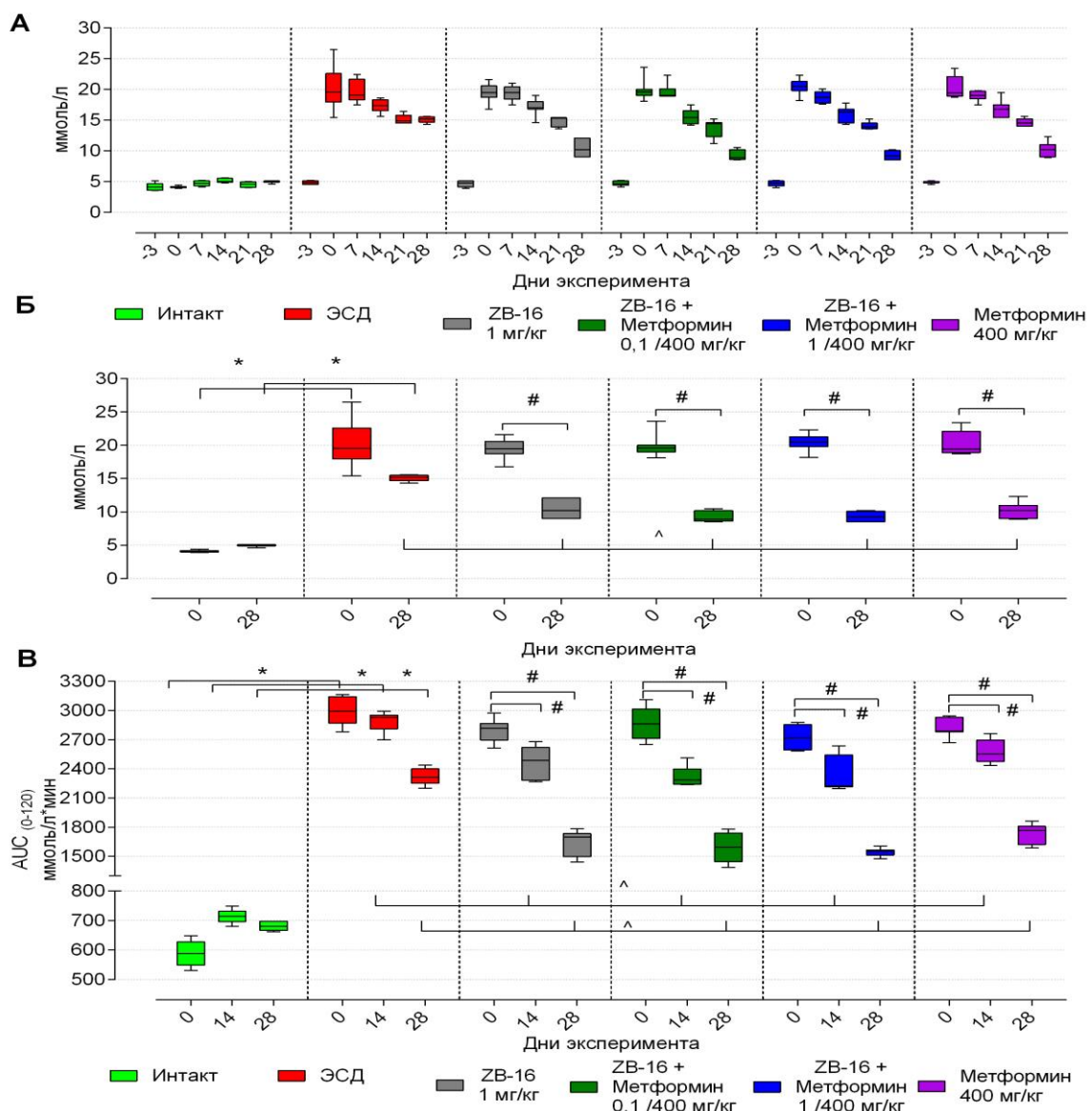


Рисунок 16. Изменение концентрации глюкозы на протяжении всего периода лечения (А), до и через 4 недели лечения (Б), а также результаты ПТТГ через 14 и 28 дней лечения (В)

В отличие от концентрации глюкозы, измеренной натощак, показатель скорости утилизации глюкозы под влиянием проводимой терапии менялся более выражено и уже через 14 дней после начала лечения достоверно отличался от значений, зафиксированных в группе с экспериментальным СД без «лечения». Спустя 28 дней «терапии» значимость различий между группами, получавшими исследуемые препараты и физиологический раствор, увеличивалась, что свидетельствует об эффективности лечения. Комбинированная терапия более эффективно повышала утилизацию глюкозы при проведении ПТТГ (рис.16, Приложение 7).

4.4 Заключение

В проведенном исследовании было подтверждено выраженное гипогликемическое действие нового агониста GPR119 – соединения ZB-16 на модели экспериментального СД. Также было установлено, что выраженность гипогликемического эффекта значительно увеличивается при его комбинировании с метформином. Установлено, что наиболее выраженное гипогликемическое действие, а также способность в значительной мере компенсировать нарушения углеводного обмена при проведении ПТТГ соединение ZB-16 оказывает в дозе 1 мг/кг. При исследовании доза-эффект в варианте комбинации различных доз соединения ZB-16 с метформином, а именно дозы 0,1 и 1 мг/кг, была отмечена их сопоставимая эффективность в снижении концентрации глюкозы в крови животных с экспериментальным СД и повышении скорости утилизации глюкозы при проведении ПТТГ. Таким образом, соединение ZB-16 оказывает выраженное гипогликемическое действие при пероральном курсовом введении животным с экспериментальным СД и улучшает утилизацию глюкозы при ПТТГ в дозе 1 мг/кг, эффект усиливается при комбинированном введении соединения ZB-16 и метформина, при этом доза ZB-16 при введении с метформином может быть уменьшена до 0,1 мг/кг без потери эффективности.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ АГОНИСТА GPR119 НА ЖИВОТНЫХ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОЖИРОВОЙ И КАЛОРИЙНОЙ ДИЕТЫ

Взаимосвязь ожирения и СД2 в настоящее время очевидна, при этом ожирение, как правило, предшествует диабету, но нередко возникает и после его манифестации, значительно отягощая состояние пациента и ухудшая прогноз заболевания. Наиболее доступные в последнее время противодиабетические лекарственные средства (препараты сульфонилмочевины, тиазолидиндионы, инсулин и его аналоги) при применении пациентами увеличивают их массу тела, что нежелательно или недопустимо при сопутствующем избыточном весе или ожирении. Известно, что ожирение является самостоятельным и одним из самых значительных рисков развития сердечно-сосудистых осложнений даже у лиц без диагноза СД2, поэтому одним из требований к разрабатываемым противодиабетическим лекарственным средствам является отсутствие влияния на процессы, способствующие увеличению массы тела. При этом желательно, чтобы современное гипогликемическое средство было способно снижать массу тела, влияя на аппетит человека, ускоряя время наступления и увеличивая продолжительность чувства сытости, снижая моторику ЖКТ.

В настоящее время уже установлена способность инкретинов регулировать аппетит. Потенциально все препараты, влияющие на биосинтез и метаболизм кишечных гормонов, обладают в той или иной степени влиянием на процессы, способствующие или противостоящие увеличению массы тела. Агонисты ГПП-1 по результатам экспериментальных и клинических исследований [Cabou C., 2011; Campbell J. E., 2013] способны снижать массу тела по некоторым механизмам, в том числе за счет подавления аппетита, пролонгации чувства сытости и изменения моторики ЖКТ. Ингибиторы ДПП-4 в клинических исследованиях [Singh A.K., 2014] показали нейтральное в отношении изменения массы тела действие.

5.1 Влияние перорального введения агониста GPR119 на массу тела, потребление воды и пищи животными с ожирением, индуцированным их содержанием в условиях высокожировой и калорийной диеты

С 1980 по 2008 гг. число лиц, страдающих ожирением, увеличилось более чем в 2 раза [Романцова Т. И., 2011]. СД2 манифестирует, как правило, в зрелом и пожилом возрасте. Почти в 50% случаев заболевание диагностируется у лиц с ожирением, а среди больных СД2 80–90% имеют избыточный вес или ожирение. Таким образом, ожирение следует рассматривать как значительную угрозу здоровью и жизни населения [Kalyvas A., 2014; Дедов И. И., 2015a].

Немедикаментозные методы лечения ожирения и СД2 практически неэффективны, а показания к бариатрическим операциям имеют существенные ограничения. Поэтому самой доступной, безопасной и эффективной тактикой терапии этих состояний остается фармакотерапия [Дедов И. И., 2012].

Способность гипогликемических лекарственных средств уменьшать массу тела, в том числе и за счет гипофагического действия, является важным дополнительным их качеством. GPR119 играет важную роль в секреции инкретинов, а в экспериментальных исследованиях пероральное введение его агонистов повышает число и качество β -клеток поджелудочной железы, снижает аппетит, а также сопровождается другими позитивными эффектами, присущими инкретинам и их миметикам [Oyama J., 2014].

Таким образом, можно ожидать, что применение соединения ZB-16 у животных с избыточной массой тела будет способно ее снижать или препятствовать увеличению. Поскольку ожирение, обусловленное диетой, легче вызвать у старых животных (меньшая естественная подвижность, сниженный гормональный фон и т.д.), исследование проводилось на старых

крысах (возрастом 20–21 мес.). Дизайн исследования схематично представлен на рис.17.

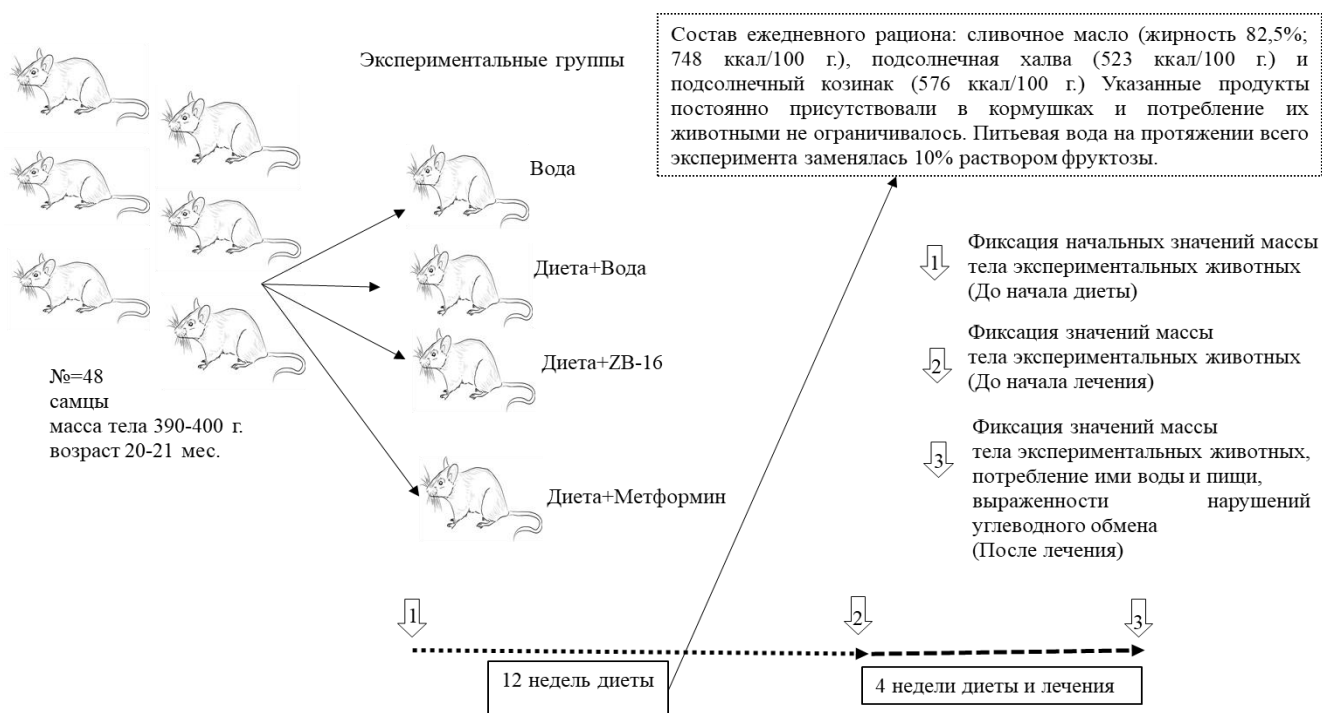


Рисунок 17 Дизайн изучения влияния перорального введения ZB-16 и метформина на некоторые метаболические показатели животных

Содержание экспериментальных животных в течение 3 месяцев на высокожировой и высококалорийной диете привело к увеличению их массы тела в среднем на 18% ($p < 0,05$, по отношению к значениям интактной группы), тогда как вес животных, содержащихся на обычном рационе (стандартный комбинированный корм (ГОСТ Р 51849-2001)), практически не менялся ($\pm 1,5\text{--}2\%$). После начала «лечения» у животных, получавших модифицированный корм и плацебо (чистую воду), масса тела увеличилась в среднем еще на 4,6 %, а у тех, которым вводили ZB-16 и метформин, наоборот, снизилась на 4,0 и 4,8% соответственно (тенденция к снижению веса наблюдалась у каждой особи из этих групп) (рис.18).

Предполагая, что исследуемые соединения влияют на аппетит и, соответственно, изменяют потребление пищи и воды, мы определили эти показатели, поместив животных в метаболические камеры на трое суток. У животных, получавших ZB-16, отмечалась четкая тенденция к уменьшению количества потребляемого корма (рис.19А) по сравнению с крысами,

находившимися на аналогичной диете, но в качестве «лечения» получавших плацебо.

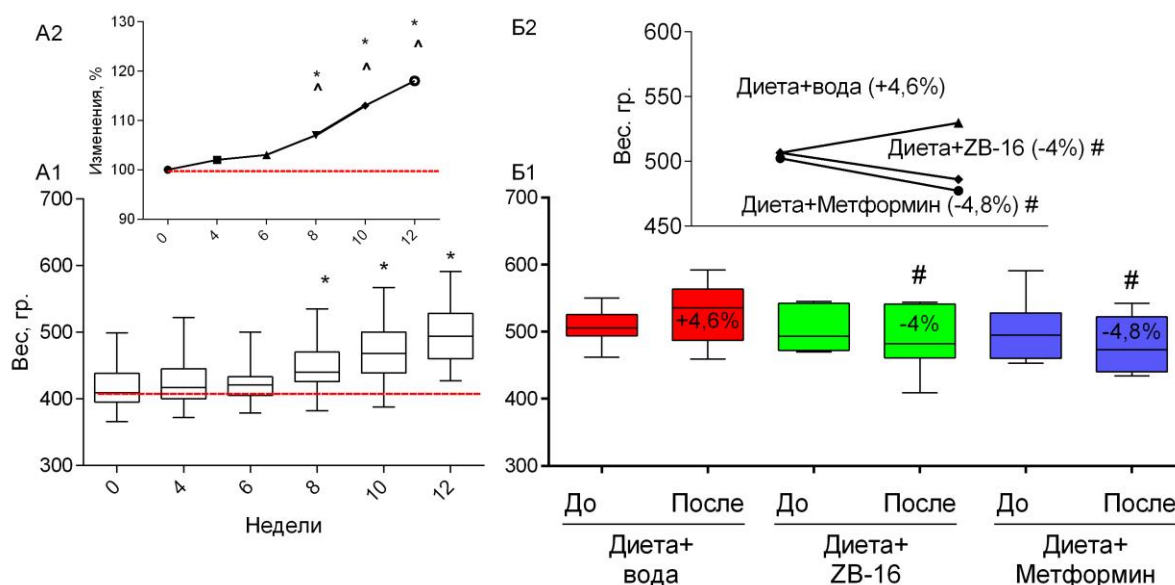


Рисунок 18 Динамика веса тела животных, содержащихся на высокожировой и высококалорийной диете в течение 12 нед. (A1, A2), а также влияние лечения на вес животных (B1, B2)

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

Способность агонистов GPR119 снижать вес тела активно изучается; для некоторых из них (в частности, для соединения PSN632408) установлено наличие гипофагического эффекта, даже при однократном введении [Cornall L. M., 2013]. Анализ результатов 17 клинических исследований инкретиномиметиков выявил анорексигенный эффект ГПП-1 и его аналогов. Воздействуя на центр голода в головном мозге, ГПП-1 снижает потребление пищи и вес тела пациентов. В двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании применение лираглутида в течение 20 недель у людей с ожирением снижало их массу тела в среднем на 7 кг [Astrup A., 2009]. Влияние агонистов GPR119 на пищевое поведение пока мало изучено. Имеются данные об участии GPR119 в регуляции аппетита, о его влиянии на скорость пассажа пищи из желудка в кишечник, на отложение жира,

процессы липогенеза и липолиза, на подавление секреции глюкагона [Cornall L. M., 2013; Lan H., 2009, 2012]. Все перечисленные эффекты агонистов этого рецептора требуют дальнейшего изучения, но снижение веса, наблюдаемое у животных при длительном введении ZB-16, позволяет предполагать, что это соединение действует по одному из описанных выше механизмов.

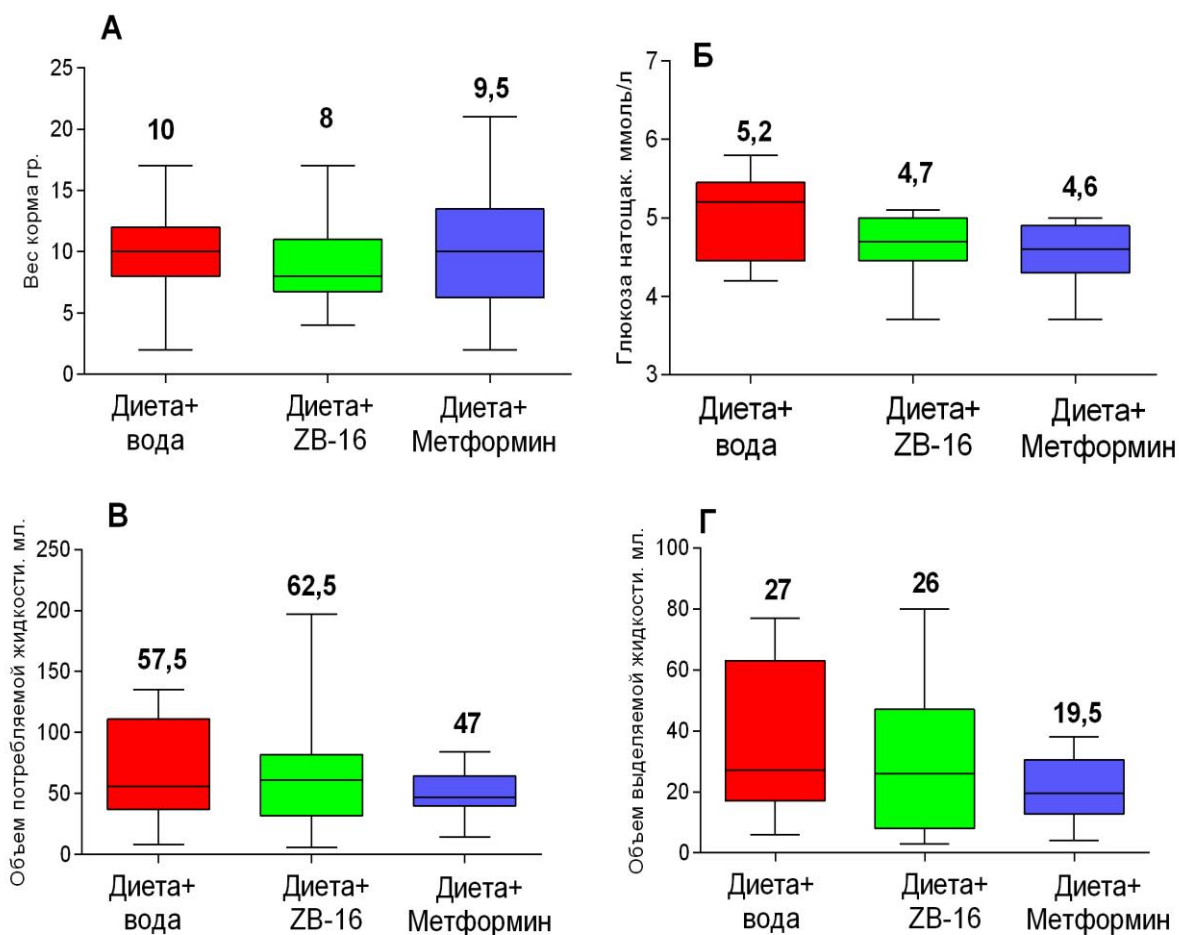


Рисунок 19. Вес съедаемого корма (А), уровень глюкозы натошак (Б), потребление (В) и выделение (Г) жидкости животными после лечения (обобщенные данные за 3 дня наблюдений)

Существенное увеличение веса животных могло быть связано с возникающими вследствие диеты нарушениями углеводного обмена. Поэтому на следующем этапе мы определяли уровень глюкозы крови натошак (рис.19Б) и толерантность к глюкозе при проведении ПТТГ (рис.20).

Содержание животных в течение 3 месяцев в условиях высокожировой и углеводной диеты не приводило к возникновению гипергликемии натошак.

Уровень глюкозы, измеренный после 6-часового голодания у этих крыс не выходил за пределы физиологической нормы, но необходимо отметить, что у животных, получавших ZB-16 и метформин, уровень глюкозы в крови натощак был несколько ниже (рис.19Б).

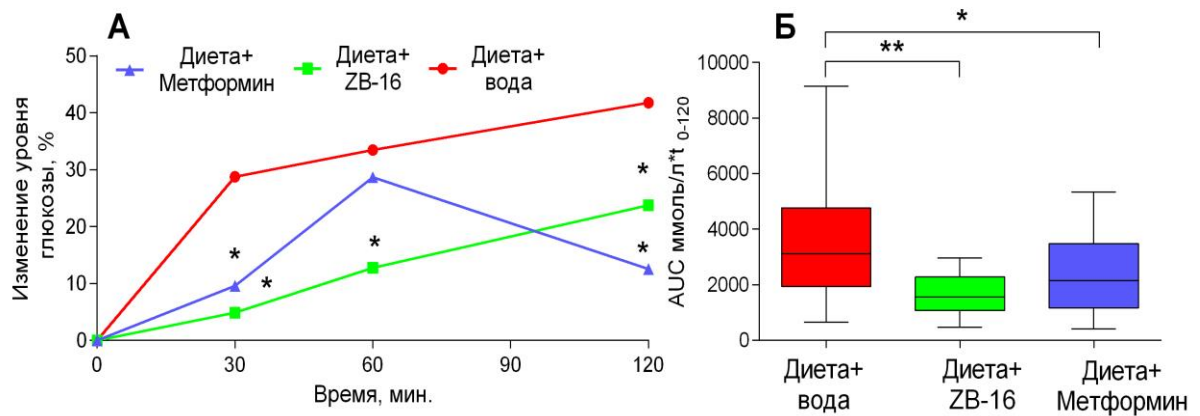


Рисунок 20. Динамика гликемии в ходе ПТТГ (в %) (А) и площадь под кривой изменений гликемии в ходе ПТТГ (Б) у животных с ожирением

Примечание: «*» - $p < 0,05$ при сравнении с группой Диета+вода; «**» - $p < 0,01$ при сравнении с той же группой

Проведение ПТТГ выявило наличие выраженных нарушений в утилизации глюкозы у крыс, содержащихся на диете и получавших плацебо. Так, через 2 часа после перорального введения глюкозы ее концентрация в крови у них была выше, чем у животных, получавших метформин и соединение ZB-16 (рис.20А). Разброс данных в пределах группы также был существенен, о чем свидетельствует диаграмма площади под кривой «концентрация глюкозы-время» (рис.20Б). Скорость и выраженность изменений в утилизации глюкозы у животных, получавших чистую воду, свидетельствуют либо о развитии инсулинрезистентности, либо о сниженной секреции инсулина, что указывает на состояние, которое может быть охарактеризовано как преддиабет или скрытая форма СД2 [Решетняк М. В., 2011].

У крыс, которые в течение 4 недель получали ZB-16, повышение концентрации глюкозы в ходе ПТТГ было значимо ниже, чем в группе, получавшей плацебо. Так, на 30-й минуте теста концентрация глюкозы в крови увеличивалась меньше, чем на 5%, тогда как в контрольной группе – на 28,8%, что может свидетельствовать об отсутствии как нарушений толерантности к глюкозе, так и об инсулинрезистентности. Через 1 час после перорального введения глюкозы у животных, получавших ZB-16, гликемия была только на 12% выше исходной, т.е. возрастала почти в 3 раза меньше, чем у крыс, получавших плацебо, и в 2,5 раза меньше, чем у животных, получавших метформин. Следует отметить, что через 1 час после нагрузки концентрация глюкозы в крови у крыс, которым вводили метформин, практически не отличалась от таковой в контрольной, что может указывать на недостаточность секреции инсулина. Низкая концентрация глюкозы на этом периоде проведения ПТТГ у крыс, которым вводили ZB-16, очевидно, связана со способностью этого соединения стимулировать глюкозозависимую секрецию инсулина и/или пролонгировать его выработку и/или действие. Через 2 часа после введения глюкозы ее уровень в крови у животных, получавших метформин, был лишь незначительно выше (+12,6%) начальной величины и значительно меньше, чем в контрольной группе (+41,8% от начальной величины). Повышенная концентрация глюкозы через 2 часа после ее перорального введения отмечалась и у животных группы, получавшей ZB-16, однако площадь под кривой «концентрация глюкозы-время» у них была наименьшей среди всех животных, содержащихся на диете. Разброс данных внутри этой группы также был минимальным. Необходимо отметить, что ни в одной из групп животных концентрация глюкозы спустя 2 часа после нагрузки не вернулась к исходным величинам, что свидетельствует о нарушенном углеводном обмене, однако выраженность этих нарушений у крыс, получавших ZB-16 и метформин, была минимальной.

В подавляющем большинстве случаев течение СД2 сопровождается значительным увеличением массы тела. В настоящее время в качестве перспективных антидиабетических препаратов рассматриваются средства, обладающие инкретиномиметической активностью [Сухарева О. Ю., 2013]. Представленные данные показывают, что содержание животных на высокожировой и высококалорийной диете вызывает нарушение углеводного обмена. Пероральное 4-недельное введение соединения ZB-16 в сопоставимой с метформином степени способствовало компенсации этих нарушений, снижая вес тела и площадь под кривой «концентрация глюкозы-время» при ПТТГ. В настоящее время значимая роль GPR119 в регуляции метаболизма углеводов за счет регуляции секреции инкретинов является очевидным фактом.

Компенсация углеводного обмена под влиянием агонистов GPR119 может происходить по нескольким механизмам. С одной стороны, эти агонисты стимулируют глюкозозависимо секрецию инкретинов, что может препятствовать быстрому росту (скачку) гипергликемии после внутрижелудочного введения глюкозы. С другой – агонисты GPR119 улучшают функцию β -клеток поджелудочной железы и стимулируют их пролиферацию, что повышает «резервные возможности» этих клеток, препятствуя резкому постпрандиальному подъему гликемии (рис.20А). Таким образом, пероральное курсовое введение соединения ZB-16 положительно влияет на углеводный обмен животных с ожирением, что оправдывает дальнейшее углубленное изучение его антидиабетических свойств.

5.2 Влияние перорального введения агониста GPR119 и его комбинации с метформином и ситаглиптином на показатели углеводного и липидного обменов, а также эндотелиальную функцию у животных, содержащихся в условиях высокожировой и калорийной диеты

На следующем этапе исследования была оценена способность агониста GPR119 соединения ZB-16 и его комбинированного введения с метформином или ситаглиптином предотвращать развитие ожирения, индуцированного диетой у молодых животных. Дизайн исследования представлен в виде схемы на рис.21.

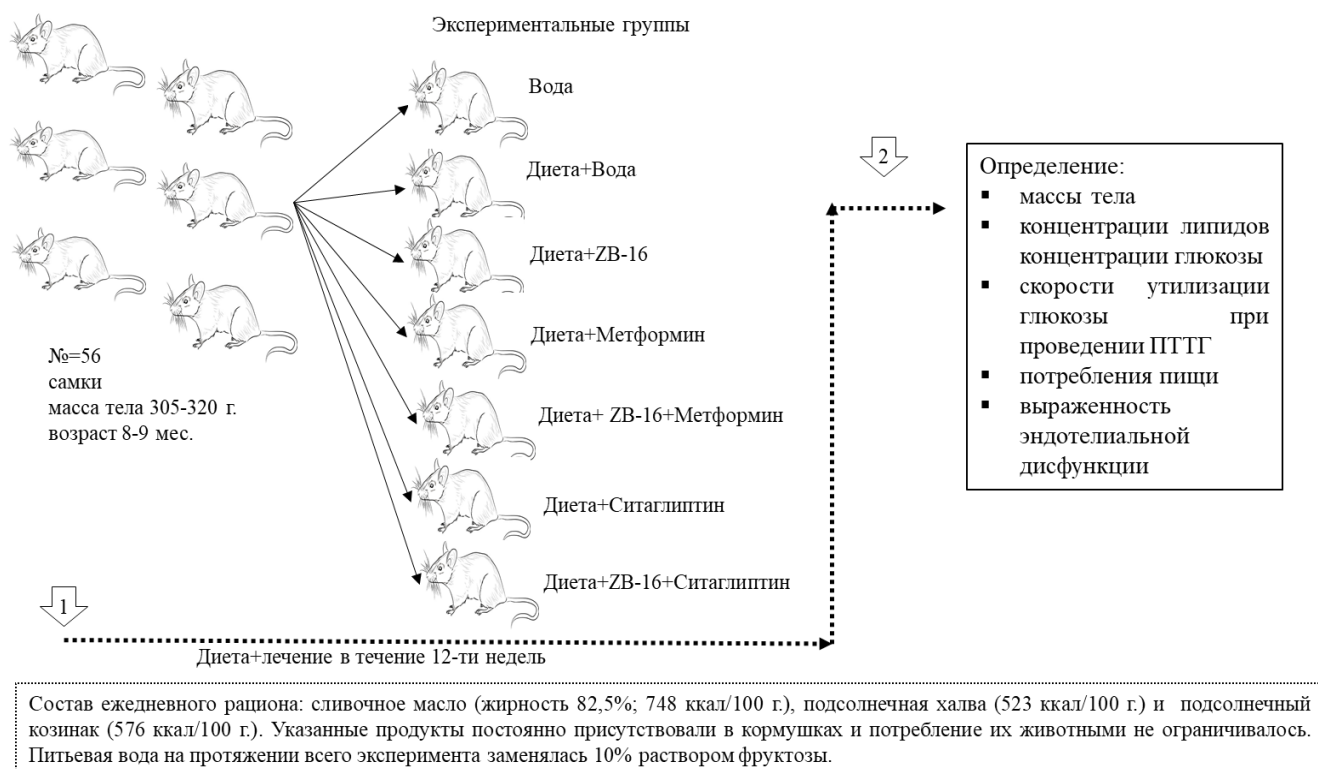


Рисунок 21. Дизайн изучения влияния перорального введения ZB-16 и метформина на некоторые метаболические показатели животных

После перевода крыс с обычного рациона на высокожировую и высококалорийную диету средний вес животных контрольной группы («Диета+вода») постепенно увеличивался и через 12 недель был выше исходного на 23% (рис.22А), тогда как вес животных, получавших комбинированный корм («Интакт»), практически не менялся (+3%). В

группах, получавших агонист GPR119 – соединение ZB-16 и его комбинацию с ситаглиптином, средняя масса животных менялась незначительно (рис.22В). Аналогичное введение животным препарата метформин и более выражено его комбинации с ZB-16 вызывало снижение массы тела животных ниже изначальных значений, несмотря на содержание их в условиях высокожировой и калорийной диеты (рис.22Б). Так, введение метформина привело к снижению массы тела в среднем на 3%, а его комбинации с ZB-16 на 10%. Ситаглиптин незначительно ограничивал увеличение массы тела животных (за 12 недель масса тела увеличилась на 12%), но снижение средней массы относительно группы «Диета + вода» не было статистически значимым ($p = 0,9$).

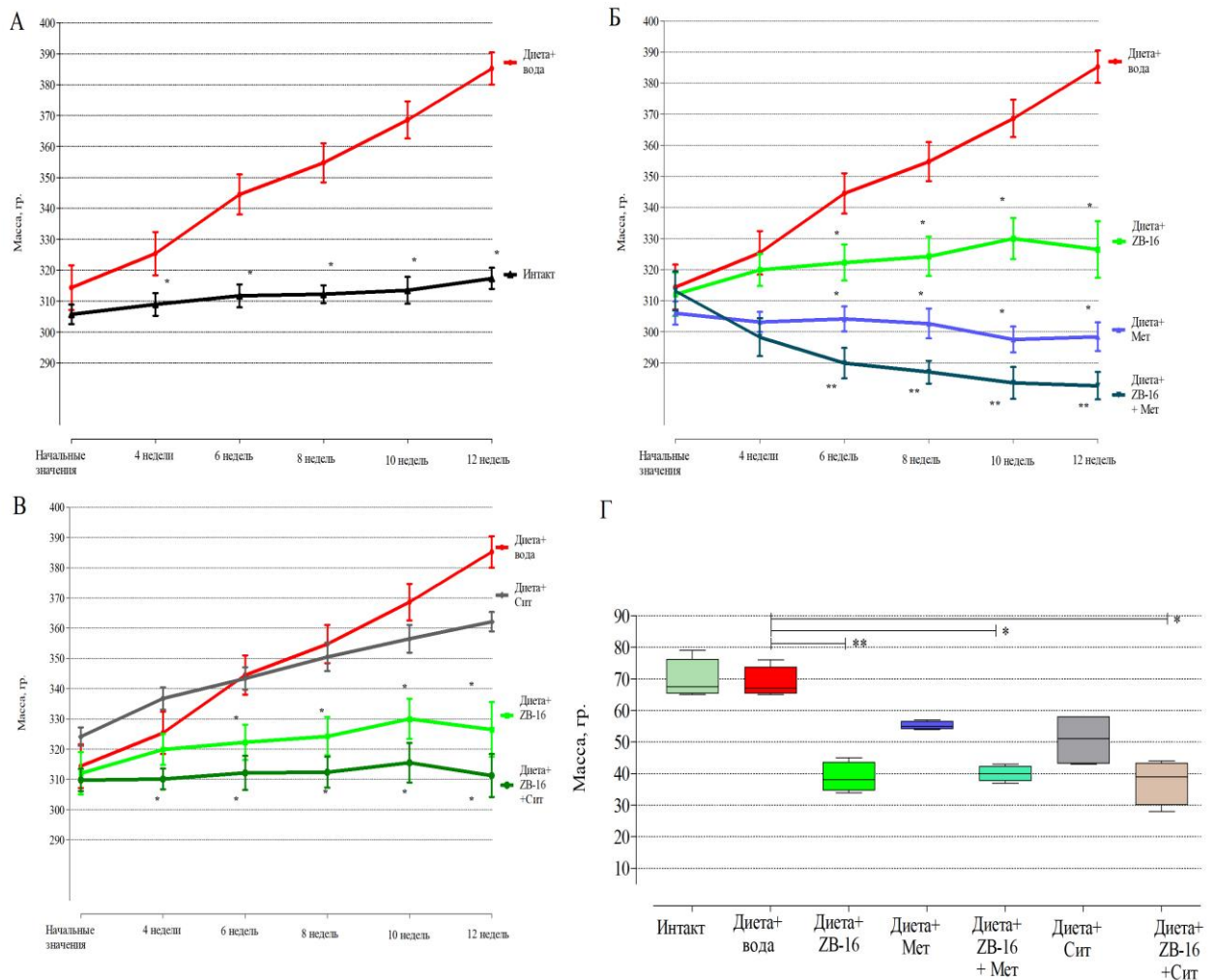


Рисунок 22. Масса животных, содержащихся в течение 12 недель в условиях высококалорийной и жировой диеты и получавших питьевую

воду (А), ZB-16 с метформином (Б) или ситаглиптином (В), а также масса съедаемого ими корма (Г)

*Примечание: *, ** – различия достоверны по отношению к группе «Диета + вода» при $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно*

На завершающем этапе исследования животные всех экспериментальных групп были помещены в метаболические камеры с индивидуальными кормушками для определения количества потребляемой пищи. Через 3 месяца диеты средняя масса съеденного корма (рис.22Г) была сопоставимой в группе «Интакт» и «Диета+вода», при этом интактные животные имели меньшую массу (более чем на 50 г). Таким образом, пищевое поведение животных с переводом их на другой рацион питания не изменилось, а увеличение массы тела в группе «Диета+вода», очевидно, связано с повышенным содержанием углеводов и жиров в потребляемой пище.

В группах, которые получали метформин и ситаглиптин, наблюдалось статистически незначимое снижение количества потребляемой пищи. В то же время животные, которые перорально получали агонист GPR119 – соединение ZB-16, а также комбинации ZB-16 с метформином и ситаглиптином, съедали значимо меньшее количество корма, по сравнению с группой «Диета+вода» ($p < 0,05$).

Уровень гликемии у животных до помещения в условия высококалорийной и жировой диеты был сопоставим (рис.23А), однако через 8 и 12 недель диеты концентрация глюкозы в крови (измеренной после 6-часового голодания) у животных без «лечения» был значимо выше, чем в интактной группе (рис.23Б, В). В опытных группах через 8 недель диеты и «лечения» значимо низкий уровень гликемии, относительно группы «Диета+вода» ($p < 0,05$), наблюдался у крыс, получавших комбинированную терапию ZB-16 с метформином или ситаглиптином (рис.23Б). Спустя 12 недель значимо низкий уровень гликемии относительно контроля отмечался

в группах, получавших как моно- ($p < 0,05$), так и комбинированную ($p < 0,01$) терапию (рис.23В).

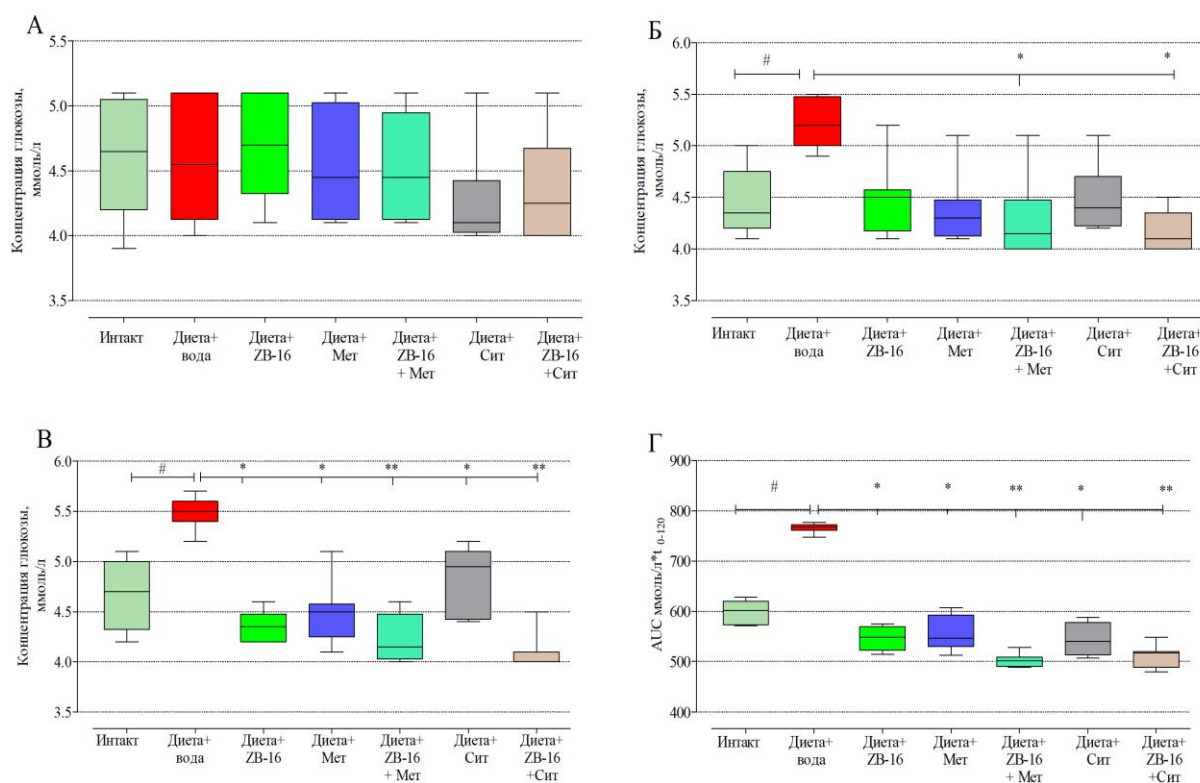


Рисунок 23. Уровень гликемии у крыс до высококалорийной и жировой диеты (А), через 8 (Б) и 12 (В) недель после ее начала. Площадь под кривой «уровень гликемии-время» при проведении перорального теста на толерантность к глюкозе через 12 недель после начала диеты (Г)

*Примечание: *, ** – различия достоверны по отношению к группе «Диета+вода» при $p < 0,05$. и $p < 0,01$ соответственно; # – различия достоверны по отношению к группе «Интакт» при $p < 0,05$*

Через 12 недель диеты при проведении ПТТГ у животных контрольной группы отмечались признаки снижения скорости утилизации глюкозы, что выражалось в значимом повышении площади под кривой «уровень гликемии-время» (рис.23Г). Во всех опытных группах значение площади под кривой было существенно ниже по сравнению с контрольной группой, при этом в группах, получавших комбинированную терапию, наблюдалось наиболее выраженное снижение ($p < 0,01$) (рис.23Г). Снижение скорости

утилизации глюкозы и увеличение ее концентрации после 6-часового голодания свидетельствуют о начале развития инсулинрезистентности, чего не отмечается у животных, получавших «лечение». При этом комбинированное «лечение» было более эффективно, чем монотерапия каждым компонентом по отдельности.

В экспериментальных исследованиях отмечено, что применение некоторых агонистов GPR119 (PSN632408, PSN821 и GSK2041706) вызывает снижение массы тела подопытных животных, в том числе и за счет наличия гипофагического эффекта [Shah U., 2012]. Комбинированное введение одного из агонистов GPR119 и метформина, при терапии ожирения в эксперименте, было значительно эффективнее монотерапии [Al-Barazanji K., 2015].

Влияние инкретиномиметиков на потребление пищи обусловлено наличием физиологической роли ГПП-1 в функционировании оси «головной мозг – кишечник». Он регулирует аппетит посредством замедления опустошения желудка, связанного с угнетением блуждающего нерва и формирования чувства насыщения, через взаимодействие с рецептором к ГПП-1 в ядрах гипоталамуса [Cabou C., 2011].

В предыдущем исследовании с использованием высококалорийной и жировой диеты соединение ZB-16 вводили в течение 4 недель после моделирования ожирения (12 недель). Введение агониста GPR119 приводило к снижению массы тела и незначительному снижению количества потребляемой пищи. В представленном исследовании лечение начиналось одновременно с началом диеты, и в данной работе помимо значительного повышения эффективности комбинированной терапии (с метформином и ситаглиптином) отмечено выраженное влияние агониста GPR119 на потребление пищи, которое было сопоставимо во всех группах, получавших ZB-16. В результате превентивного назначения агониста GPR119 (в качестве регулятора потребления пищи) в условиях высококалорийной диеты повышается его эффективность, что соответствует современным

представлениям о целесообразности раннего начала лечения нарушений углеводного обмена.

Введение метформина также приводило к ограничению набора массы тела и снижению совокупного за три дня объема, съеденного животными корма. Однако масса тела на протяжении всего эксперимента у животных, получавших метформин, была меньше, чем у тех, которые получали ZB-16, а количество съедаемого животными корма было больше. Это указывает на то, что метформин в меньшей степени влияет на пищевое поведение животных, а масса тела снижается не за счет уменьшения потребления пищи, а, возможно, путем снижения концентрации инсулина и инсулинрезистентности, продукции глюкозы печенью, интенсивности процессов липогенеза или другими механизмами. Совместное применение метформина и ZB-16 приводило к более выраженному ограничению набора массы, что, очевидно, связано не только с влиянием на потребление пищи животными, но и с эффектами, свойственными метформину.

Замена нормального пищевого рациона на диету с высоким содержанием жиров и углеводов приводит к значимой прибавке веса и нарушению утилизации глюкозы у экспериментальных животных. Введение агониста GPR119 (ZB-16), метформина, ситаглиптина и их комбинаций, при содержании в условиях высококалорийной и жировой диеты, приводит к снижению потребления пищи, ограничению прибавки веса животными, нормализации параметров углеводного обмена. Агонист GPR119 значительно снижает потребление пищи, а добавление к ZB-16 метформина и ситаглиптина не приводит к более выраженному снижению количества потребляемого корма, однако комбинированное введение вызывает более значимое снижение массы тела и повышение скорости утилизации глюкозы по сравнению с контрольной группой в условиях высококалорийной и жировой диеты.

В контрольной группе через 12 недель после перевода на диету с избыточным содержанием углеводов и жиров средняя масса животных

увеличилась на 22,8% и была достоверно выше ($p < 0,05$), по сравнению с интактной (Рисунок 24). В опытной группе на фоне введения агониста GPR119 прирост массы тела был незначительным (+2,9%), а в группе, получавшей метформин и комбинацию ZB-16 с метформином, масса тела уменьшилась соответственно на 3,3% и 9,7% (Рисунок 24 А).

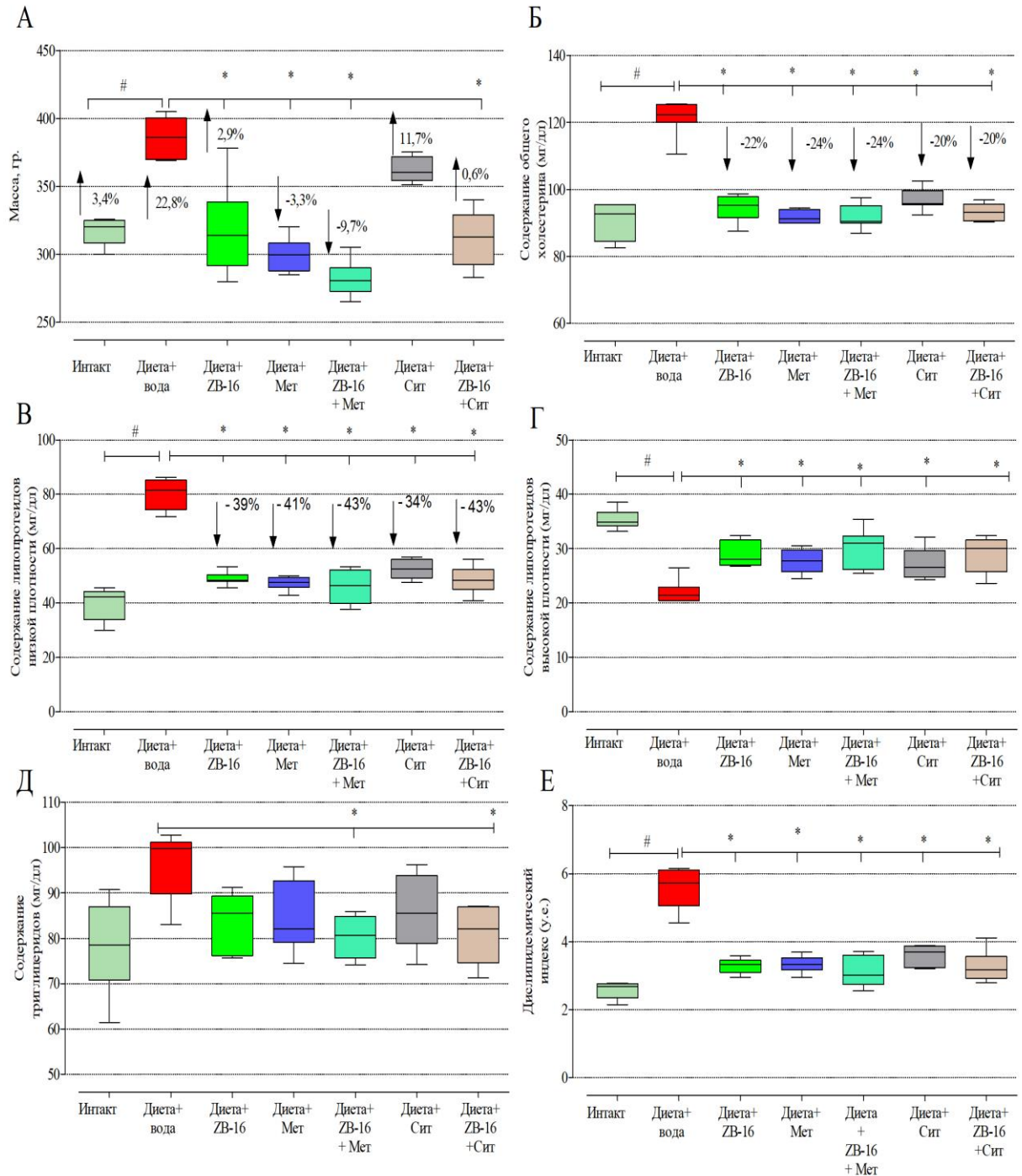


Рисунок 24. Масса тела (А), содержание общего холестерина (Б), ЛПНП (В), ЛПВП (Г), триглицеридов (Д) в плазме и дислипидемический

индекс (Е) у животных, содержащихся 12 недель в условиях высокожировой и калорийной диеты

*Примечание: # – различия достоверны по отношению к группе «Интакт» при $p < 0,05$; * – различия достоверны по отношению к группе «Диета+вода» при $p < 0,05$; стрелками показаны изменения средней массы животных за 12 недель диеты (%)*

Через 12 недель после перевода на диету изменения липидного спектра у животных контрольной группы по сравнению с интактной заключались в значимом повышении содержания общего холестерина и ЛПНП, а также снижении уровня ЛПВП в плазме ($p < 0,05$) (рис.24Б, В, Г, Д). У крыс, которым на протяжении 12 недель вводили ZB-16, препараты сравнения и их комбинации, уровень холестерина, триглицеридов, ЛПНП был статистически значимо ниже, а ЛПВП выше, чем в группе негативного контроля ($p < 0,05$) (рис.24Б, В, Г, Д). Дислипидемический индекс у животных, получавших «лечение», был также ниже ($p < 0,05$) значений контрольной группы (рис.24Е).

Избыточный вес, ожирение и эндотелиальная дисфункция являются неотъемлемыми спутниками и ведущей причиной сердечно-сосудистых осложнений практически у всех пациентов с диагнозом СД2 [Дедов И.И., 2016а; Могильницкая Л.А., 2016; Стаценко М.Е., 2016].

В современных рекомендациях по лечению СД для пациентов с сопутствующим ожирением в дебюте заболевания отмечено предпочтительное назначение гипогликемических препаратов, которые снижают массу тела (аГПП-1 и ингибиторы натрий-глюкозного ко-транспортера 2 типа) и корректирует нарушения липидного обмена (бигуаниды) [Дедов И. И., 2017]. По ряду исследований некоторые препараты данных групп снижают риск развития сердечно-сосудистых осложнений СД и проявляют прямое эндотелиопротекторное действие в условиях гипергликемии [Дегтярь Н. И., 2016; Shigiyama F., 2017].

Учитывая ведущую роль эндотелиальной дисфункции в развитии сердечно-сосудистых осложнений СД, для целенаправленного поиска

препаратов, снижающих риск осложнений, целесообразно проводить оценку эндотелиопротективного потенциала новых соединений на стадии экспериментальных исследований.

У животных контрольной группы через 12 недель диеты наблюдалась тенденция к снижению скорости мозгового кровотока ($p = 0,07$), при этом во всех опытных группах мозговой кровоток был на уровне интактной (рис.25А).

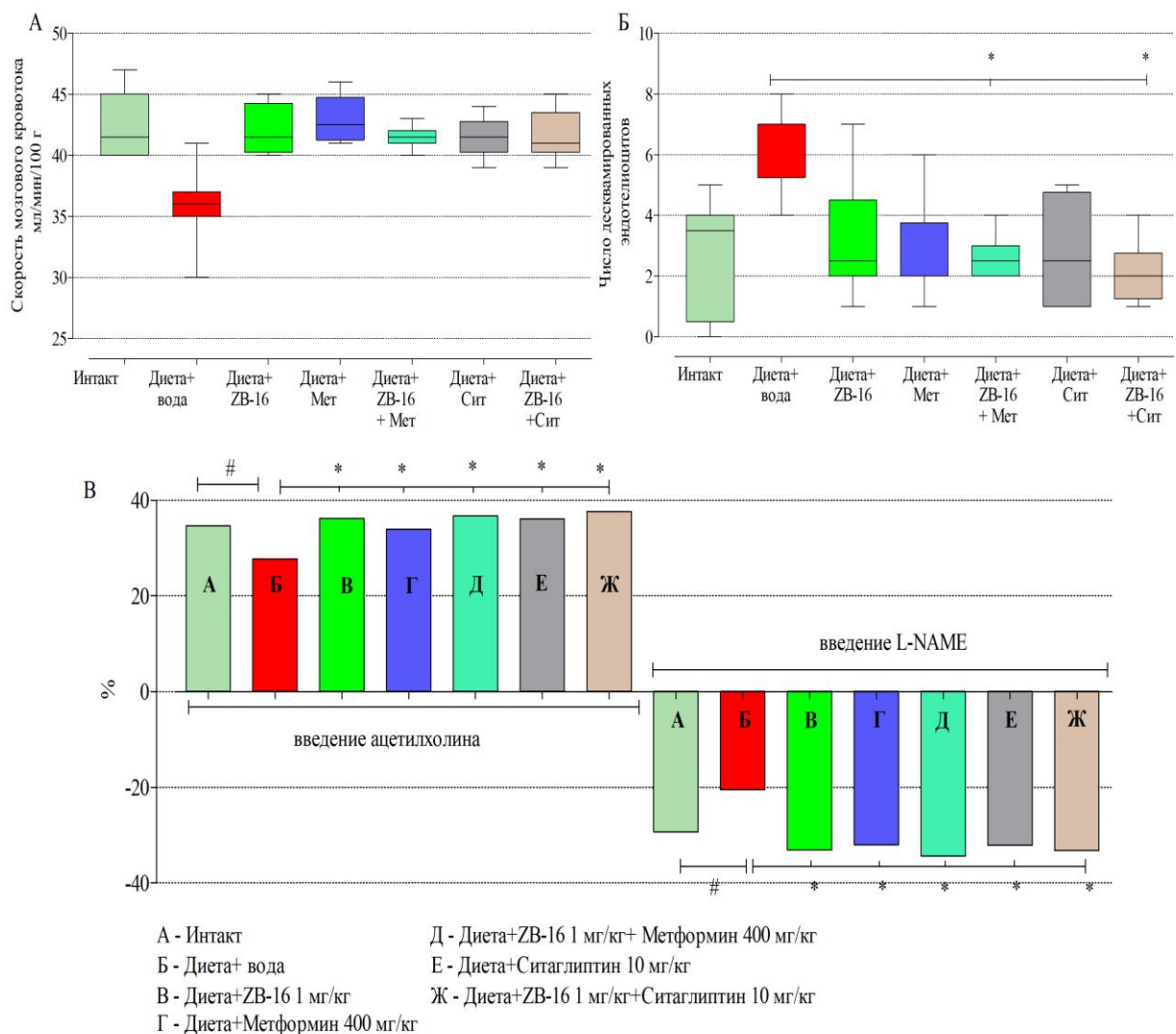


Рисунок 25. Мозговой кровоток (А), число десквамированных эндотелиоцитов (Б) и изменения мозгового кровотока при введении модификаторов синтеза оксида азота (В) у животных, содержащихся в условиях высокожировой и калорийной диеты

*Примечание: # – различия достоверны по отношению к группе «Интакт» при $p < 0,05$; * – различия достоверны по отношению к группе «Диета+вода» при $p < 0,05$*

Число десквамированных эндотелиоцитов незначимо повышалось у контрольных животных ($p = 0,09$), однако в группах, получавших комбинированную терапию, данный показатель был значимо ниже ($p < 0,05$) (рис.25Б).

На последнем этапе исследования у животных оценивалась выраженность эндотелийзависимых реакций сосудов при введении модификаторов синтеза оксида азота. В контрольной группе наблюдалось статистически значимое уменьшение выраженности эндотелийзависимых реакций, отражающих снижение стимулированной (уменьшение реакции на введение ацетилхолина) и базальной (уменьшение реакции на введение L-NAME) продукции оксида азота ($p < 0,05$) (рис.25В). При этом, во всех опытных группах, получавших «лечение», выраженность эндотелийзависимых реакций сосудов головного мозга была на сопоставимом с интактной группой уровне.

Пандемия СД2 в значительной мере обусловлена повышением потребления высококалорийных продуктов питания, что нередко сочетается с понижением физической активностью. Развитие СД2 сопровождается формированием эндотелиальной дисфункции, которая возникает вследствие гипергликемии, а в сочетании с дислипидемией приводит к развитию атеросклероза, микро- и макроангиопатий. Эффективная профилактика эндотелиальной дисфункции и дислипидемии является ключевым звеном в снижении риска развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с СД2.

Не все применяющиеся гипогликемические препараты способны снижать массу тела, улучшать липидный профиль и оказывать эндотелиопозитивное действие, что необходимо учитывать при выборе гипогликемических препаратов или их комбинаций. Необходимо отметить, что часто лекарственная терапия назначается пациентам не в начале

заболевания, а в более поздний период, когда появляется выраженная клиническая симптоматика на фоне развивающейся эндотелиальной дисфункции. При этом раннее начало лечения и использование рациональных комбинаций гипогликемических препаратов позволяет значительно снизить риск развития сердечно-сосудистых заболеваний [Дедов И. И., 2017].

Возникновение и развитие метаболических нарушений сопровождается дефектами в работе системы инкретинов, устранение которых является перспективным подходом для повышения эффективности лечения метаболических заболеваний, в т.ч. СД2 и ожирения. Так согласно клиническим рекомендациям по лечению СД от 2017 года [Дедов И. И., 2017], гипогликемическим препаратам с инкретиновой активностью отдается приоритет при монотерапии СД2 в дебюте заболевания и для комбинированной терапии с низким риском гипогликемии.

В представленном исследовании терапия начиналась одновременно с переводом животных на высокожировую и калорийную диету, и было выявлено, что соединение ZB-16, метформин и более выраженно их комбинация предупреждает увеличение массы тела, что, очевидно, связано с характерным для инкретиномиметиков влиянием на аппетит и метаболизм углеводов, при этом у всех животных, получавших гипогликемическую «терапию», было обнаружено снижение выраженности нарушений липидного обмена.

Отсутствие значимых различий между вариантами проводимой терапии может быть следствием нескольких факторов: соединение ZB-16, референтные препараты и их комбинации в данном исследовании были сопоставимы по эффективности при длительности диеты 12 недель. Исследуемое вещество и референтные препараты, при различных механизмах действия, сопоставимо влияют на липидный профиль и функциональное состояние эндотелия у животных в условиях высокожировой и калорийной диеты.

Нарушение эндотелийзависимой вазодилатации у животных контрольной группы позволяет предполагать снижение стимулированной (уменьшение реакции на введение ацетилхолина) и базальной (уменьшение реакции на введение L-NAME) продукции оксида азота, что может быть следствием уменьшения активности эндотелиальной нитрооксидсинтазы. Учитывая отсутствие статистически значимых различий в скорости локального мозгового кровотока и концентрации циркулирующих эндотелиоцитов в крови у животных интактной и контрольной группы, можно предположить, что содержание молодых животных в условиях высокожировой и калорийной диеты в течение 12 недель не привело к выраженным проявлениям эндотелиальной дисфункции, признаки которой были выявлены при проведении провокационных проб. При этом у животных всех опытных групп, получавших терапию с началом диеты, уровень мозгового кровотока и выраженность эндотелийзависимых реакций были на сопоставимом с интактной группой уровне.

5.3 Заключение

Среди гипогликемических препаратов с доказанной способностью снижать вес тела находятся аГПП-1 и ингибиторы натрий-глюкозного ко-транспортера 2 типа (иНГЛТ-2). В то же время остальные препараты либо не влияют (ингибиторы ДПП-4, ингибиторы α -глюкозидаз), либо увеличивают массу тела (тиазолидиндионы, препараты сульфонилмочевины и инсулина) [Дедов И. И., 2017]. Для лечения ожирения, которое наблюдается у большинства пациентов с СД2 или с течением времени трансформируется в него [Дедов И. И., 2016а, 2017, Ткачук В. А., 2014], возможностей для проведения фармакотерапии значительно меньше. Многие из препаратов для снижения веса, получивших разрешение на использование, в последующем были запрещены или имеют существенные ограничения к применению (сIBUTрамин, римоНабант, лоркасерин и некоторые другие). Наиболее

длительно, эффективно и одновременно безопасно, с целью снижения лишнего веса, используется орлистат (Ксеникал), однако побочные эффекты со стороны желудочно-кишечного тракта ограничивают его применение большинством пациентов. Определенное влияние на массу тела у пациентов с СД2 и ожирением оказывает метформин, но его эффективность у лиц с избыточной массой тела без СД и инсулинрезистентности незначительная [Seifarth C., 2013; Dong Z., 2017].

С появлением информации о роли нарушений в инкретиновой системе в патогенезе СД2 инкретиномиметики начали рассматриваться в качестве препаратов, способствующих снижению массы тела у пациентов с СД2. Инкретинопосредованная терапия (иДПП-4, аГПП-1) СД признается одной из самых безопасных и эффективных, а в 2012 году препарат лираглутид, рекомендованный для лечения СД2 в дозах 1,2 и 1,8 мг в сутки (Виктоза), получил одобрение FDA в качестве средства для лечения ожирения (в дозе 3 мг, Саксенда) [Dong Z., 2017].

Средства, влияющие на систему инкретинов, активно используются для комбинированной терапии СД. Одной из рациональных комбинаций признано сочетание ингибиторов ДПП-4 с метформином, который улучшает функциональное состояние энтероэндокринных клеток (снижает апоптоз в условиях СД), что приводит к увеличению количества секретируемых инкретинов и повышению эффективности иДПП-4 [Bahne E., 2016].

Повышение секреции ГПП-1 и ГИП рассматривается как новый подход к фармакологической регуляции работы системы инкретинов. А соединения, стимулирующие их секрецию (агонисты рецептора GPR119), позиционируются как средства для моно- и комбинированной терапии СД2. При этом, с учетом имеющихся клинических данных и теоретических предпосылок, наиболее целесообразными препаратами-кандидатами для создания рациональных комбинаций с агонистами GPR119 являются метформин [Al-Barazanji K., 2015] и ингибиторы ДПП-4 [Park Y. H., 2017].

В проведенных исследованиях соединение ZB-16 в монотерапии на модели экспериментального СД проявляло гипогликемическую активность, а в условиях высококалорийной диеты способствовало снижению массы тела. Поскольку для достижения эффективного контроля гликемии, в том числе при ожирении, активно используются рациональные комбинации гипогликемических препаратов, в настоящем исследовании была произведена оценка эффективности агониста GPR119 в комбинации с другими гипогликемическими лекарственными препаратами.

ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АГОНИСТА GPR119

Установление механизма гипогликемического действия является одной из важнейших задач, стоящих перед фармакологической наукой. Исходя из структуры соединения и данных, полученных *in vitro* на этапе первичного скрининга агонистов GPR119, мы предполагали, что пероральное введение соединения ZB-16 будет стимулировать секрецию инкретинов и инсулина, а также снижать концентрацию глюкагона в плазме крови. Изучение влияния перорального введения соединения ZB-16 на концентрацию ГПП-1, инсулина, глюкагона и глюкозы было выполнено на животных с экспериментальным СД.

Инкретины являются метаболическими гормонами, которые снижают уровень глюкозы в крови. Этот эффект обеспечивается увеличением количества инсулина, высвобождаемого из β -клеток поджелудочной железы. Они также ингибируют высвобождение глюкагона из α -клеток островков Лангерганса. Кроме того, стоит упомянуть, что инкретины (ГИП и ГПП-1) замедляют апоптоз панкреатических β -клеток, вызывают репарацию и рост островков поджелудочной железы [Ленская К.В., 2011; Yoshida S., 2011].

ГПП-1, а соответственно, и его миметики стимулируют секрецию инсулина. Мы предположили, что помимо увеличения секреции инсулина инкретины, возможно, продлевают его действие, поэтому нами был проведен тест на толерантность к инсулину на фоне предварительного перорального введения соединения ZB-16.

Поскольку известно, что инкретины способны влиять на процессы апоптоза и пролиферации, в том числе и в β -клетках поджелудочной железы, а также поскольку гомеостаз глюкозы зависит от морфофункциональной целостности β -клеточного аппарата поджелудочной железы, нами была оценена выраженность повреждений этой ткани. С помощью ИГХ было оценено количество инсулинпозитивного материала в ткани поджелудочной

железы, содержание маркеров апоптоза и пролиферации. Дизайн исследования представлен на рис.26.

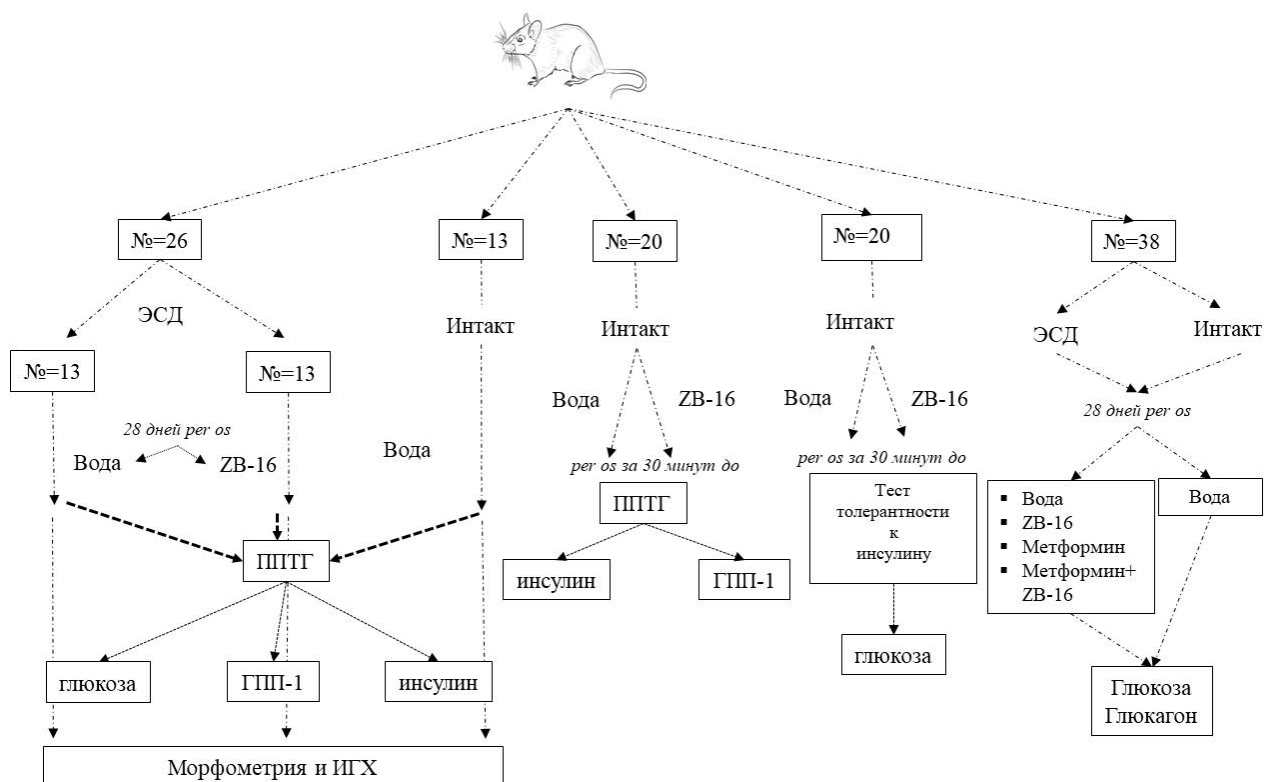


Рисунок 26. Дизайн исследования влияния перорального введения соединения ZB-16 на секрецию ГПП-1, глюкозы и инсулина

6.1 Оценка влияния перорального введения соединения ZB-16 на секрецию ГПП-1, глюкагона и инсулина^{††}

Начальный уровень ГПП-1 у животных с экспериментальным СД был ниже, чем у интактных и тех, которым вместо воды 28 дней перорально давали соединение ZB-16 (рис.27A1, A2). Так, у животных с экспериментальным СД, получавших «терапию» агонистом GPR119, начальный уровень ГПП-1 был выше на 121% ($p < 0,001$), чем в группе, получавшей плацебо, в то же время пероральное введение соединения ZB-16 за 30 минут до измерения концентрации ГПП-1 приводило к увеличению

^{††} Исследование выполнено совместно с к.м.н. Д.А. Бакулиным

содержания этого гормона на 119% ($p < 0,001$). Таким образом, пероральное введение соединения ZB-16 вне зависимости от наличия или отсутствия СД повышает секрецию ГПП-1 в плазме животных.

Начальные концентрации инсулина в крови интактных животных были практически одинаковыми (рис.27Б1, Б2), что свидетельствует о глюкозозависимом характере секреции инсулина в ответ на выработку инкретинов, что особенно важно, поскольку доказывает отсутствие риска развития гипогликемии.

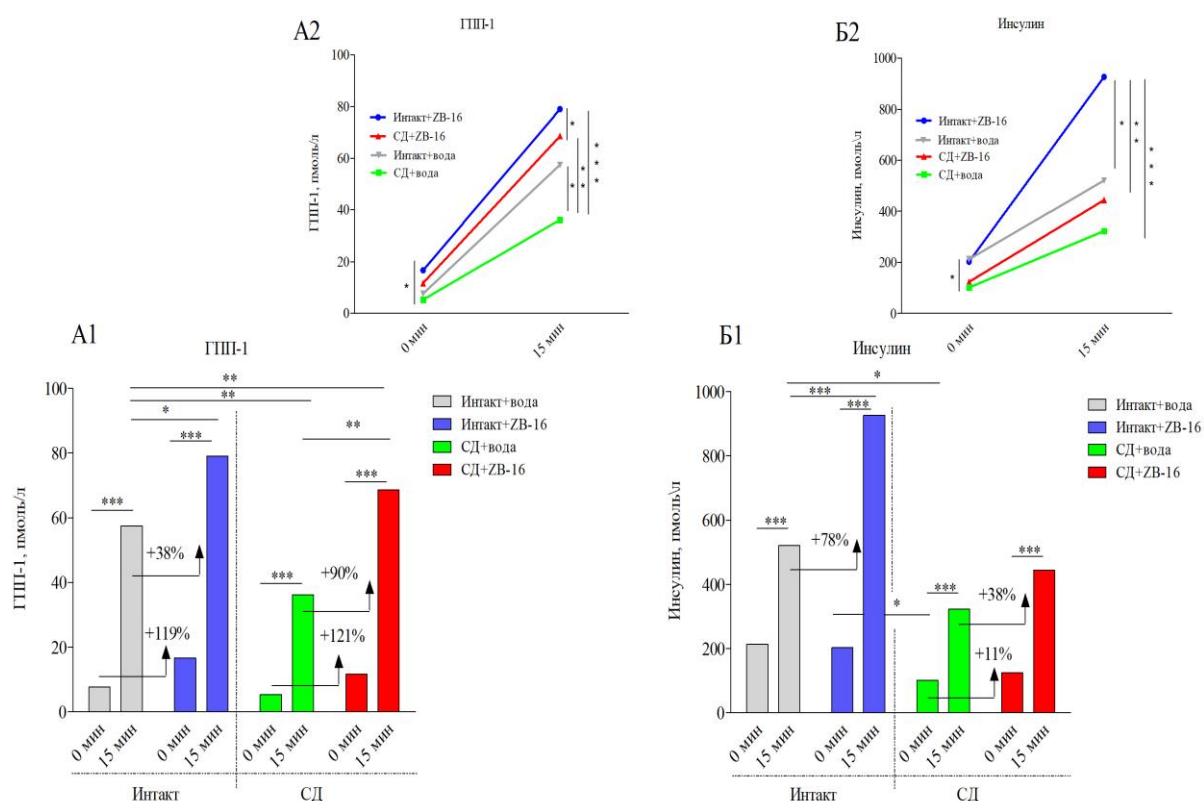


Рисунок 27. Влияние агониста GPR119 ZB-16 на концентрации ГПП-1 (A1, A2), инсулина (Б1, Б2) при пероральном введении интактным и животным с ЭСД при проведении ПТТГ

При измерении концентрации ГПП-1 через 15 минут после пероральной глюкозной нагрузки было обнаружено, что у интактных животных концентрация инкретина увеличилась на 38% ($p < 0,01$) больше, чем у животных, получивших плацебо. Аналогичное измерение у животных с экспериментальным СД показало, что у тех, которым давали плацебо,

секреция ГПП-1 была меньше, чем у интактных животных, но введение ZB-16 повышало его концентрацию, и, в итоге, этот показатель отличался от группы плацебо более, чем на 90%. Секреция ГПП-1 на фоне предварительно введенного ZB-16 у животных с экспериментальным СД была выше, чем в интактной группе. Значения концентрации инсулина, зафиксированные у животных с экспериментальным СД до пероральной нагрузки глюкозой, но через 30 минут после перорального введения ZB-16, были больше отмеченных в группе плацебо, на 11%, но значительно ниже, чем у интактных. Измерение концентрации инсулина через 15 минут после внутрижелудочного введения глюкозы показало, что она возрастала в обеих группах, но более выражено под влиянием ZB-16. Так, концентрация инсулина в группе, животные которой получили ZB-16, через 15 минут после перорального введения глюкозы была на 38% ($p < 0,01$) выше значений, зафиксированных в группе, получавшей плацебо. Секреция инсулина, стимулированная глюкозой, в группах без метаболических нарушений была выше, чем у животных, которым моделировали экспериментальный СД, при этом дополнительное введение ZB-16 приводило к более высокому подъему концентрации инсулина. Разница в концентрации инсулина между животными обеих интактных групп составила 78% ($p < 0,01$). Стимулированная секреция инсулина у животных, которым моделировали экспериментальный СД и 28 дней вводили ZB-16, была сопоставима со значениями интактной группы животных, которые получали плацебо.

Секреция инсулина проходит несколько этапов после секреции ГПП-1. Уровни ГПП-1 достигают максимальной концентрации через 15–20 минут после перорального введения глюкозы.

Секреция инсулина у животных с экспериментальным СД снизилась более выражено, чем ГПП-1, что, связано не только с уменьшением способности клеток секретировать инкретины, но и с очевидной деструкцией β -клеток поджелудочной железы. В ходе исследования не было обнаружено значимых различий между уровнями ГПП-1 и инсулина через 15 минут после

введения глюкозы между животными с экспериментальным СД, которые получали соединение ZB-16, и интактными. В то же время измерение концентрации глюкозы до и через 15 минут после перорального ее введения показало повышенные значения при обоих измерениях. Начальное значение концентрации глюкозы у животных, терапевтически получавших соединение ZB-16, было ниже, чем у тех, которым вводили плацебо, но значительно выше, чем у интактных. В то же время при измерении этого показателя через 15 минут после глюкозной нагрузки уровень глюкозы в крови возрастал, но менее значительно, чем в группе, животные которой получали плацебо. Изначально высокая концентрация глюкозы и отмеченная выраженная под действием перорального введения соединения ZB-16 (сопоставимая с уровнем интактных животных) секреция инсулина может свидетельствовать о том, что введение агониста GPR119, влияет на секрецию инсулина, но не на его синтез. Можно предположить, что это приводит к значительному постпрандиальному увеличению его концентрации, но недостаточность его продукции в отсроченные периоды подтверждается повышенным уровнем глюкозы в крови животных с экспериментальным СД, несмотря на курсовое терапевтическое введение агониста.

В исследовании влияния 28-дневного терапевтического перорального введения агониста GPR119 и его комбинации с метформином животным с экспериментальным СД на концентрацию глюкозагона было установлено, что у тех животных, которым вводилось соединение ZB-16 с метформином или без него, концентрация гормона была сопоставимой и минимальной среди животных всех исследуемых групп (рис.28, рис.29).

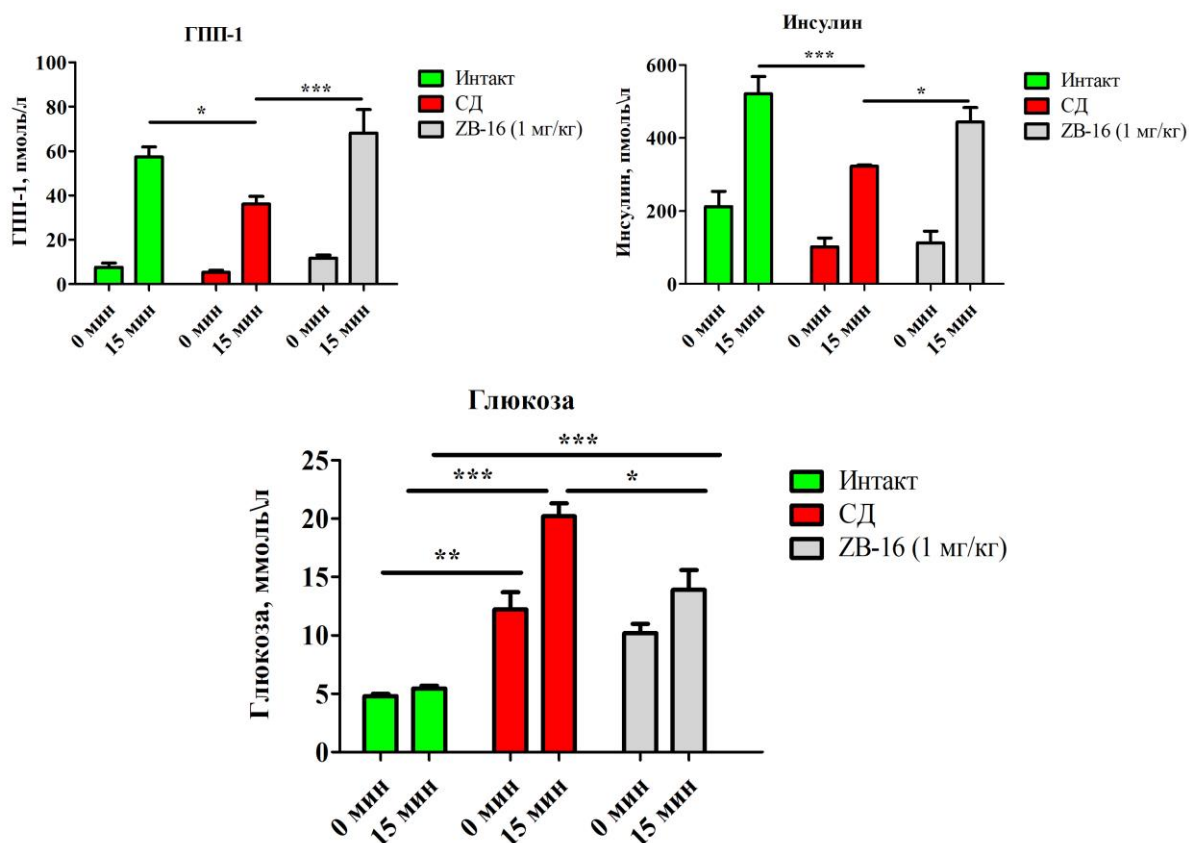


Рисунок 28. Влияние агониста GPR119 ZB-16 на концентрации ГПП-1, инсулина и глюкозы при проведении ПТТГ у животных с ЭСД после 28-ми дней лечения

Примечания: различия достоверны, критерий Ньюмена Кейлса: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

У животных, которым смоделировали экспериментальный СД и затем в течение 28 дней перорально вводили соединение ZB-16 и его комбинацию с метформином, концентрации глюкагона были минимальными, что, очевидно, связано со способностью ГПП-1 подавлять его секрецию α -клетками поджелудочной железы. При этом концентрация глюкагона в этих группах была сопоставима между собой, что показывает ведущую роль соединения ZB-16 на этот показатель. В то же время курсовое терапевтическое введение животным с экспериментальным СД метформина в значительной степени компенсировало нарушения углеводного обмена, что выражалось в более низких концентрациях глюкозы в крови, измеренных натощак, но при этом

концентрация глюкагона была выше. Таким образом, при сопоставимых значениях концентрации глюкозы в крови уровень глюкагона между животными, которые получали соединение ZB-16, в том числе и в комбинации с метформином, и только метформин, различались более чем в 2 раза. У животных, которые получали метформин, концентрация глюкагона была меньше, чем у получавших плацебо, и практически не отличалась от значений интактной группы. Соединение ZB-16 более выражено, чем метформин снижает концентрацию глюкагона, при этом их комбинирование не приводит к увеличению эффекта, что может быть следствием достижения предела эффективности или невозможности дальнейшего снижения концентрации глюкагона в крови экспериментальных животных.

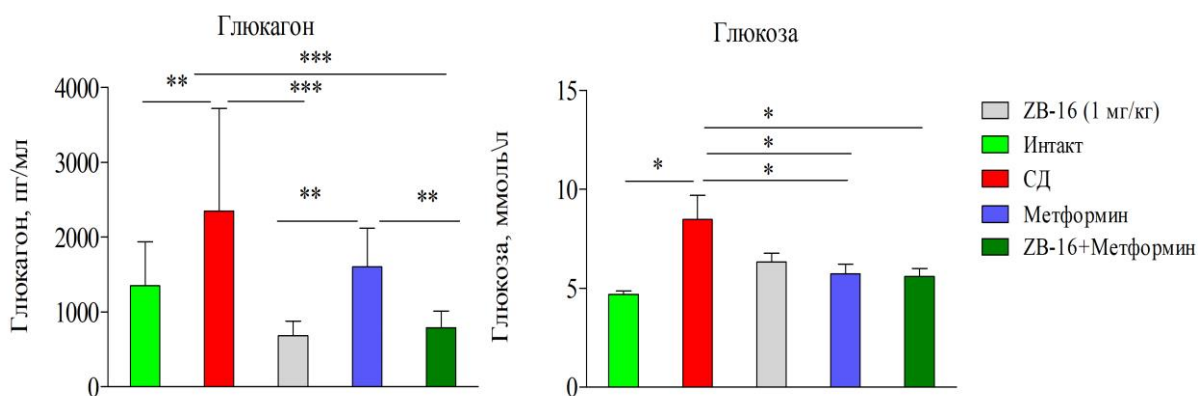


Рисунок 29. Влияние агониста GPR119 ZB-16 и его комбинации с метформином на концентрацию глюкагона и глюкозы у животных с ЭСД после 28 дней лечения

*Примечания: различия достоверны критерий Ньюмена Кейлса: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$*

6.2 Оценка влияния перорального введения соединения ZB-16 на длительность действия экзогенного инсулина

Учитывая увеличение концентрации инсулина путем стимуляции секреции ГПП-1 и подавления глюкагона под действием соединения ZB-16,

мы предположили, что его пероральное введение может пролонгировать действие инсулина. Одной из задач исследования также была оценка того, насколько выражено применение соединения ZB-16 будет пролонгировать действие экзогенного инсулина. Это важно, поскольку можно предположить суммирование гипогликемического действия, вызванного увеличенным количеством эндогенного и экзогенного инсулина. Как отмечалось выше, секреция инсулина под действием ZB-16 имеет глюкозозависимый характер, однако изменение концентраций инсулина под действием агониста GPR119 имеет важное клиническое значение. В то же время оценка влияния соединения ZB-16 на действие экзогенного инсулина позволит оценить его действие и в отношении эндогенного.

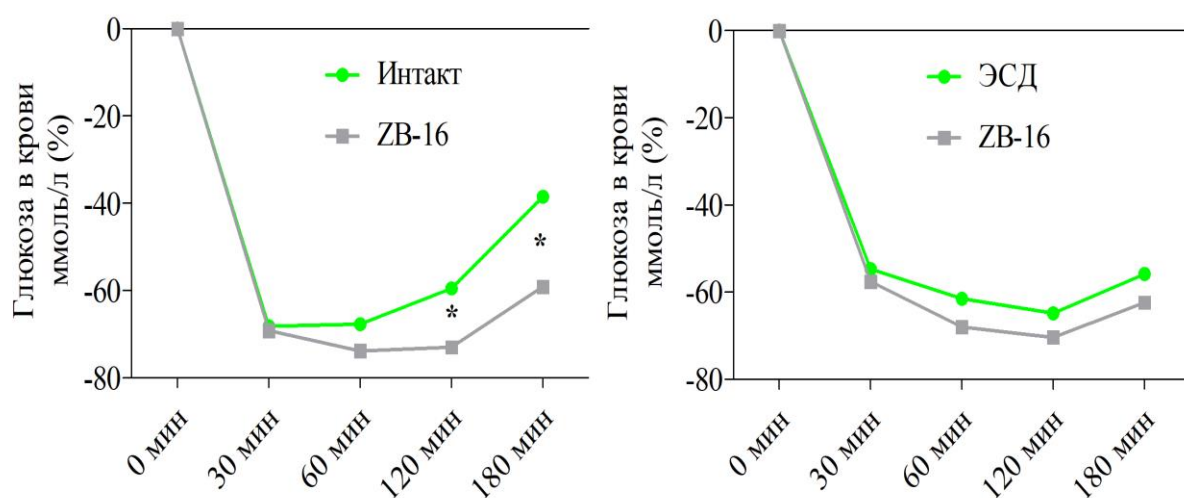


Рисунок 30. Динамика уровня гликемии (%) при проведении инсулинового теста толерантности (ИТТ) на интактных (А) и животных с ЭСД (Б)

*Примечание: * – достоверно по отношению к группе Интакт ($p < 0,05$)*

После введения инсулина интактным животным в контрольной группе наблюдалось повышение уровня гликемии с 60 по 180 минуту, а в опытной группе на 120 и 180 минутах теста наблюдался значимо меньший уровень гликемии (рис.30А). Таким образом, ZB-16 пролонгирует действие инсулина,

что может быть связано или с увеличением его секреции, или чувствительностью тканей к нему.

На животных с экспериментальным СД сахароснижающий эффект тех же доз инсулина (30 минут) выражен меньше, чем у животных без экспериментального СД (рис.30Б). У животных, получавших соединение ZB-16 в течение 4 недель, эффекты экзогенного инсулина были более выраженными по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, при курсовом введении ZB-16 животным с экспериментальным СД отмечается тенденция к потенцированию эффектов экзогенного инсулина, но менее выражено, чем у интактных животных, что может быть связано с меньшей инсулин-секретирующей функцией поджелудочной железы.

6.3 Оценка влияния перорального введения соединения ZB-16 на морфологические изменения в ткани поджелудочной железы крыс с ЭСД^{§§}

На завершающем этапе исследования у животных с изначальным уровнем глюкозы в крови 8–16 ммоль/л (после моделирования экспериментального СД), которые в течение 4 недель перорально получали соединение ZB-16 (0,1 и 1 мг/кг) или плацебо (вода), после эвтаназии с помощью гильотины забирали биологический материал для проведения морфологических исследований. Ткань поджелудочной железы извлекали путем выделения брыжейки двенадцатиперстной и тонкой кишки с последующим разделением на три равных фрагмента – область, прилежащая к двенадцатиперстной кишке; желудочная область и селезеночная область.

^{§§} Исследование выполнено совместно с кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО ВолгГМУ, за что выражаем искреннюю благодарность зав. кафедрой, д.м.н. А.В. Смирнову и всем сотрудникам

При гистологическом исследовании у здоровых животных (интактная группа животных) панкреатические островки были характерной правильной формы с ровными контурами. В различных отделах поджелудочной железы островки существенно отличались в размерах. При проведении иммуногистохимического исследования с использованием антител против инсулина выявлено преобладание инсулин-позитивных β -эндокриноцитов в панкреатических островках во всех отделах железы. Иммуногистохимическое исследование с использованием антител против белка Ki-67 (маркер пролиферации) и фермента каспаза-3 выявило наличие ядерной экспрессии маркера пролиферации в единичных эндокриноцитах, в то время как маркер апоптоза в образцах не присутствовал (рис.31, рис.33, рис.34, рис.35).

У животных с экспериментальным СД отмечалось слабо выраженное полнокровие кровеносных сосудов. Периинсулярная соединительная ткань в ряде случаев была частично инфильтрирована лимфоцитами, отмечался отек. Панкреатические островки в различных отделах поджелудочной железы имели неправильную форму, неровные контуры, были резко уменьшены в размерах, их количество также было ниже, чем в интактной группе. Средняя площадь и периметр панкреатических островков по сравнению с интактной группой были меньше на 82,9% ($p < 0,001$) и 60,0% ($p < 0,001$). При проведении иммуногистохимического исследования ткани поджелудочной железы контрольных животных с использованием антител против инсулина выявлено выраженное уменьшение абсолютной и относительной площади иммунореактивного материала, количества инсулин-позитивных β -эндокриноцитов в панкреатических островках во всех отделах железы по сравнению с интактной группой. При этом в части островков отмечалось увеличение объемной доли инсулин-негативных эндокриноцитов (Рисунок 32). Морфометрическое исследование показало, что абсолютная и относительная площади инсулин-позитивных эндокриноцитов в панкреатических островках при окрашивании антителами к инсулину по

сравнению с интактной группой были меньше на 95,5% ($p < 0,001$) и 44,2% ($p < 0,001$) соответственно.

При проведении иммуногистохимического исследования с использованием антител против белка Ki-67 (маркер пролиферации) отмечалась меньшая, вплоть до полного отсутствия, экспрессия иммунореактивного материала в эндокриноцитах панкреатических островков животных с ЭСД и не получавших лечения (у интактных животных отмечено наличие ядерной экспрессии иммунореактивного материала в единичных эндокриноцитах панкреатических островков). В то же время при использовании антител против каспаза-3 (Рисунок 36) отмечалось увеличение экспрессии иммунореактивного материала в эндокриноцитах панкреатических островков, которая встречалась в единичных клетках (у интактных животных отмечено отсутствие цитоплазматической экспрессии иммунореактивного материала в эндокриноцитах панкреатических островков). При морфометрическом исследовании отмечалась тенденция к увеличению абсолютной площади каспаза-3-позитивных эндокриноцитов на 10,2 % ($p > 0,05$) и значимое увеличение относительной площади каспаза(3)-позитивных эндокриноцитов в панкреатических островках при окрашивании антителами к инсулину по сравнению с интактной группой на 4,2% ($p < 0,001$) соответственно, что свидетельствует о возрастании апоптозно-измененных эндокриноцитов.

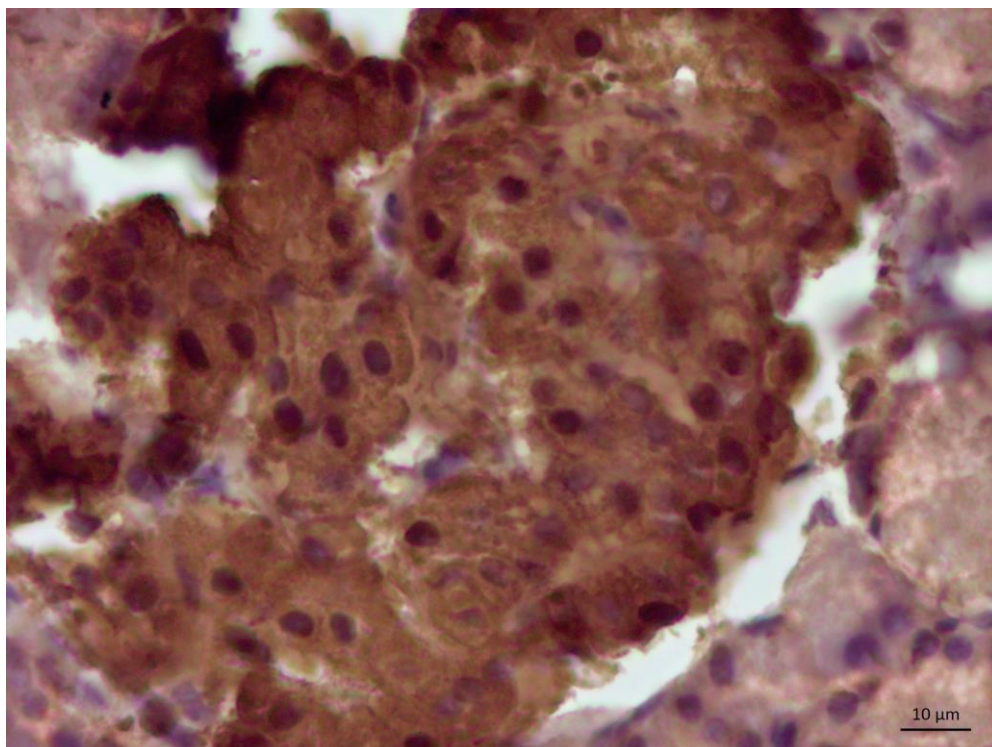


Рисунок 31. Эндокринная часть (островок) поджелудочной железы интактной крысы с преобладанием инсулин-позитивных β -эндокриноцитов. ИГХ с АТ против инсулина. Об. X 40

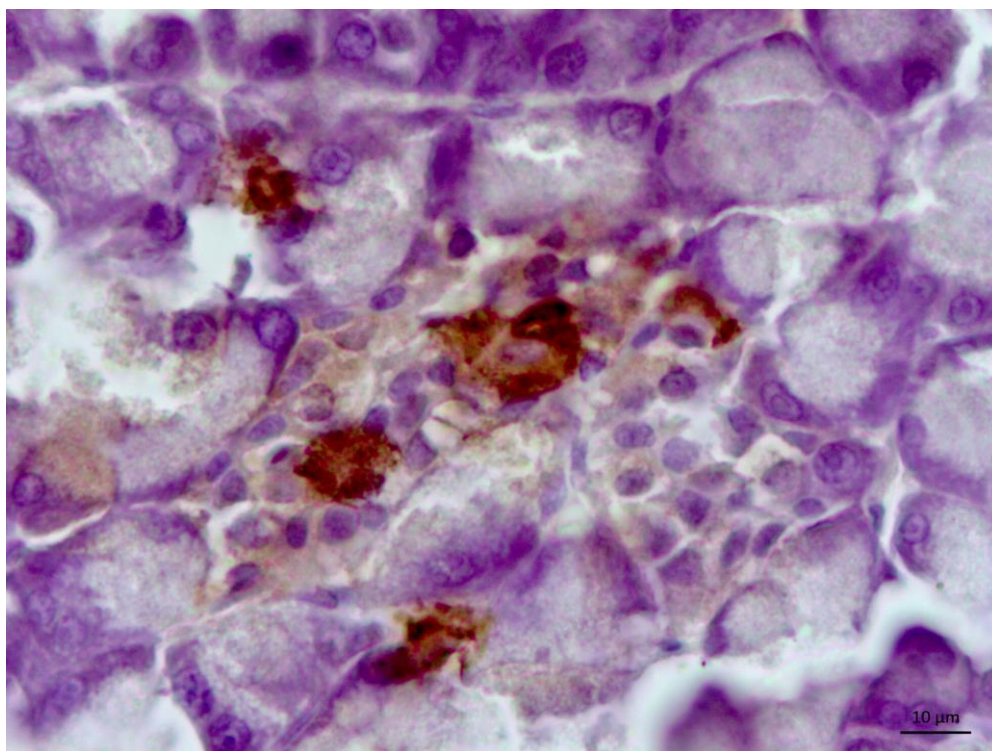


Рисунок 32. Эндокринная часть (островок) поджелудочной железы контрольной крысы (СД) с резко выраженным снижением инсулин-позитивных β -эндокриноцитов. ИГХ с АТ против инсулина. Об. X 40

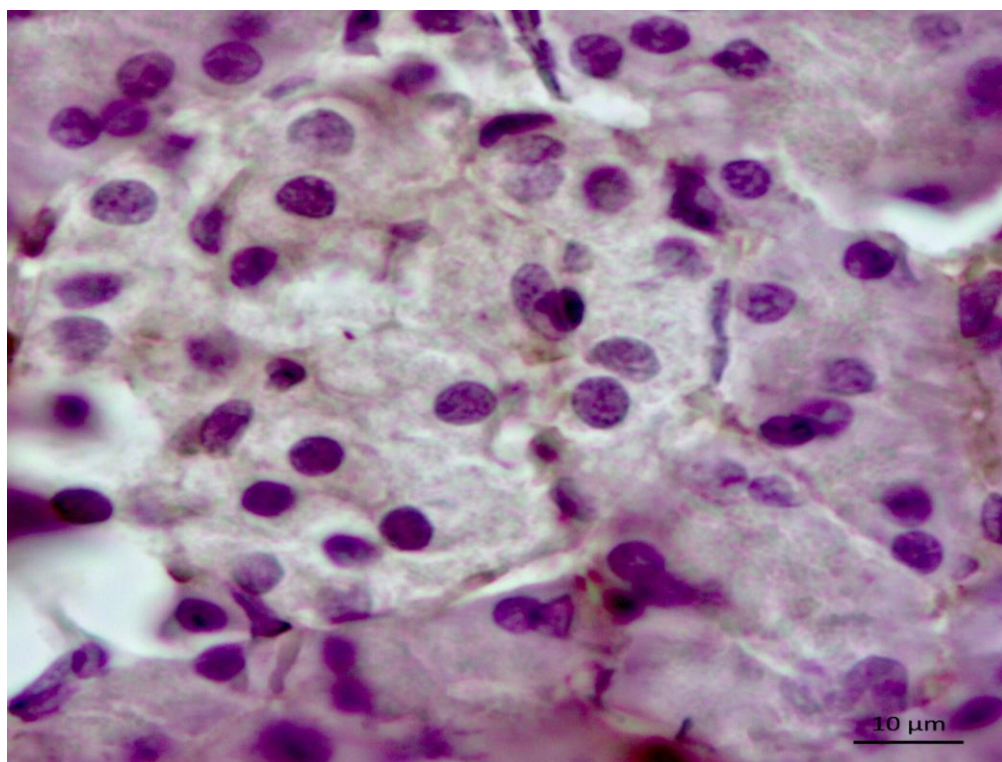


Рисунок 33. Эндокринная часть (островок) поджелудочной железы интактной крысы с отсутствием Ki-67-позитивных эндокриноцитов. ИГХ с АТ против Ki-67. Об. X 40

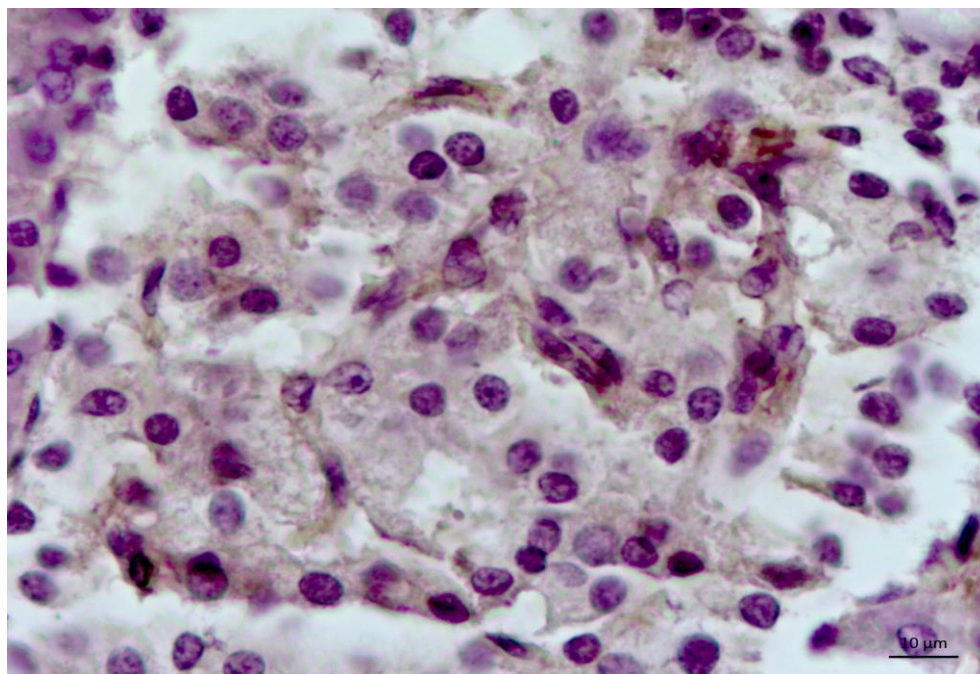


Рисунок 34. Эндокринная часть (островок) поджелудочной железы интактной крысы с единичными Ki-67-позитивными эндокриноцитами. ИГХ с АТ против Ki-67. Об. X 40

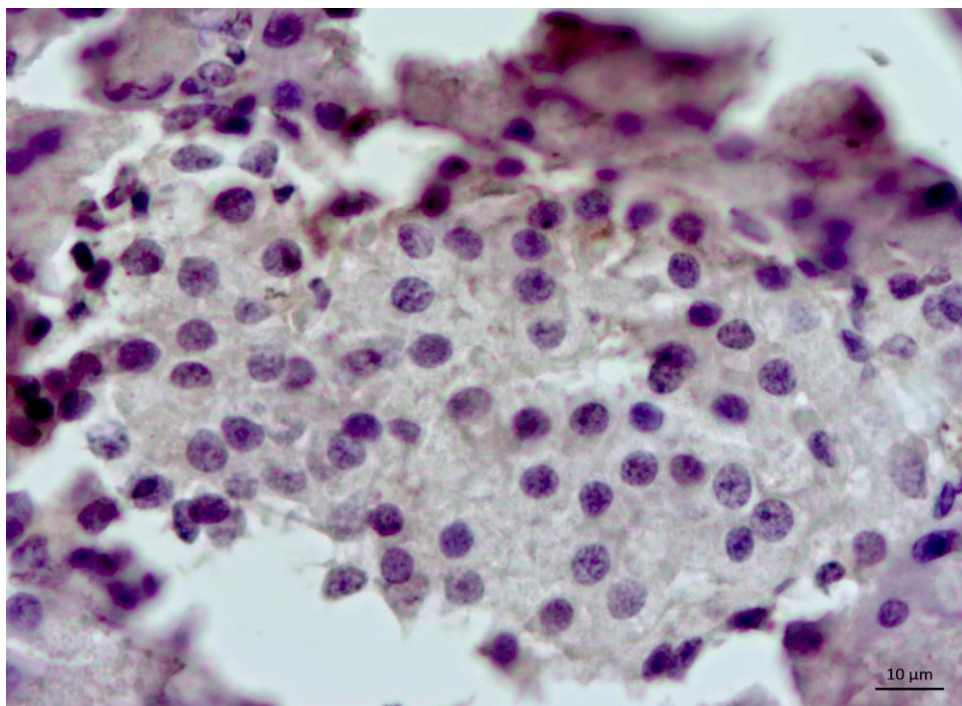


Рисунок 35. Эндокринная часть (островок) поджелудочной железы интактной крысы с отсутствием каспаза-3-позитивных эндокриноцитов. ИГХ с АТ против каспаза-3. Об. X 40

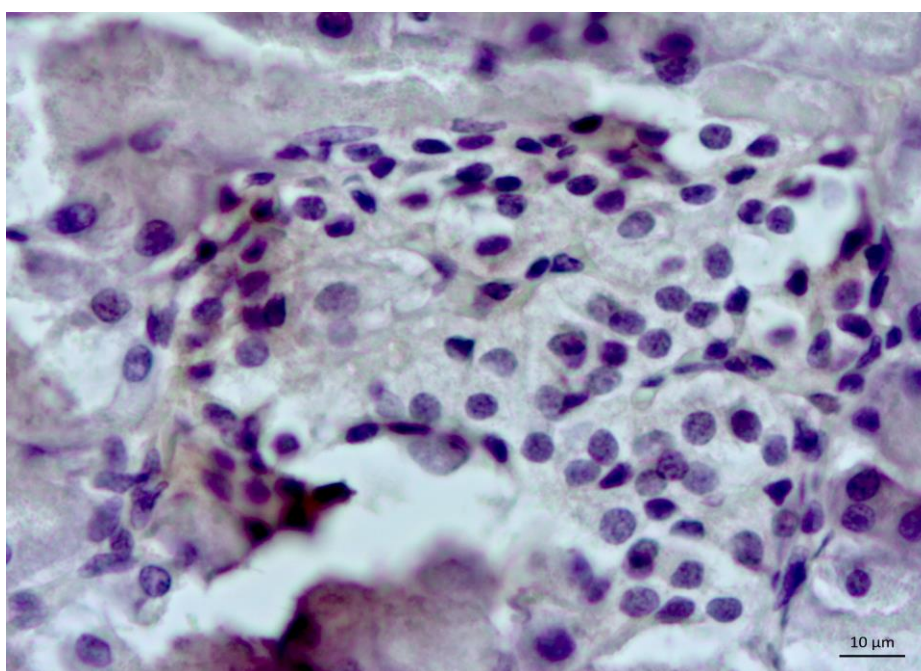


Рисунок 36. Эндокринная часть (островок) поджелудочной железы контрольной крысы (СД) с появлением слабой цитоплазматической экспрессии каспаза-3 в эндокриноцитах. ИГХ с АТ против каспаза-3. Об. X 40

При гистологическом исследовании ткани поджелудочной железы у животных, получавших соединение ZB-16 в дозах 0,1 и 1 мг/кг, размеры панкреатических островков и их количество были сопоставимы с интактной группой (или выше). У животных, которые курсом получали соединение ZB-16, фиксировалась большая относительно контрольной группы (СД+физ. раствор) абсолютная и относительная площадь иммунореактивного материала, а также количество инсулин-позитивных β -эндокриноцитов в панкреатических островках во всех отделах железы. При морфометрическом исследовании отмечалось достоверное увеличение площади и периметра панкреатических островков на 510% ($p < 0,01$) и 140% ($p < 0,001$) соответственно, а также возрастание абсолютной и относительной площади инсулин-позитивных эндокриноцитов в панкреатических островках при окрашивании антителами к инсулину по сравнению с контрольной группой (СД) на 1136% ($p < 0,001$) и 18,7% ($p < 0,001$), соответственно. По сравнению с интактной группой площадь панкреатических островков в группе ZB-16 (1 мг/кг) была незначительно выше (на 4,5% ($p > 0,05$)), отмечена тенденция к снижению периметра панкреатических островков на 3,6% ($p > 0,05$), абсолютной площади инсулин-позитивных эндокриноцитов на 44,0% ($p > 0,05$), а относительная площадь инсулин-позитивных эндокриноцитов была ниже на 25,5% ($p < 0,001$). Содержание Ki-67 и каспаза-3 в исследуемых образцах группы, получавшей соединение ZB-16, было выше и соответственно ниже, чем в контрольной группе, что свидетельствует об активации процессов регенерации и снижении апоптотических процессов в ткани поджелудочной железы после стрептозотоциновой интоксикации (рис.37, рис.38, рис.39, рис.40, рис.41, рис.42).

При морфометрическом исследовании ткани поджелудочной железы животных, получавших соединение ZB-16 в дозе 1 мг/кг, отмечалась более низкая абсолютная и относительная площадь каспаза-3-позитивных эндокриноцитов на 41,9% ($p < 0,05$) и на 4,9% ($p < 0,001$), соответственно, что свидетельствует об уменьшении количества эндокриноцитов

панкреатических островков в состоянии апоптоза при пероральном введении ZB-16 (1 мг/кг). В то же время значения относительной площади каспаза-3-позитивных эндокриноцитов в панкреатических островках были практически равны зафиксированным в контрольной группе. Следует отметить, что абсолютная площадь каспаза-3-позитивных эндокриноцитов была меньше на 35,9% ($p < 0,001$) по сравнению с интактной группой, что может отражать уменьшение количества и/или размеров иммунореактивных эндокриноцитов при нормализации размеров островков.

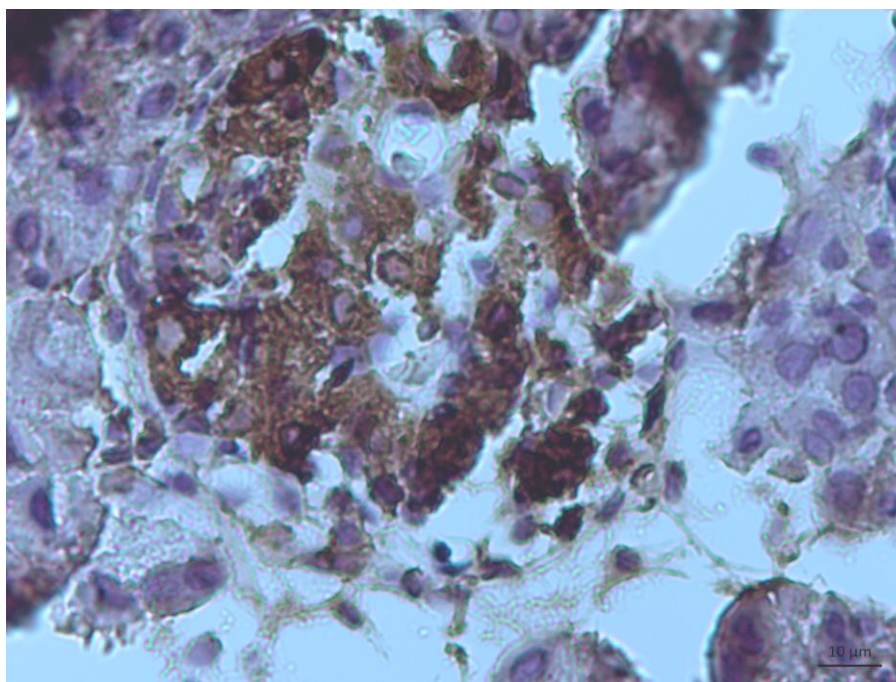


Рисунок 37. Эндокринная часть (островок) поджелудочной железы крысы СД+ZB-16 (1 мг/кг). Увеличение количества инсулин-позитивных β -эндокриноцитов. ИГХ с АТ против инсулина. Об. X 40

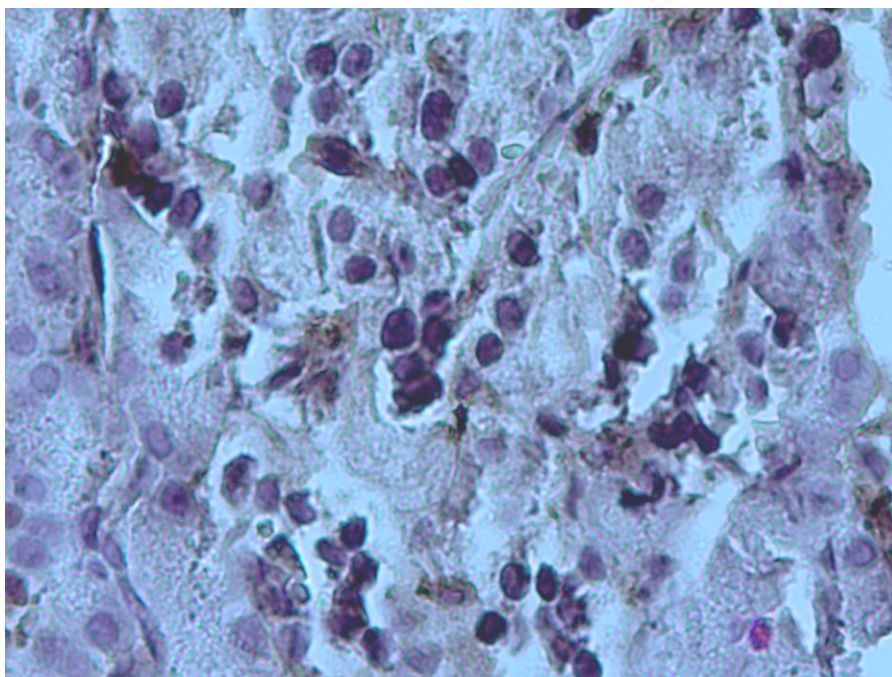


Рисунок 38. Эндокринная часть (островок) поджелудочной железы крысы СД+ZB-16 (1 мг/кг). ИГХ с АТ против Ki-67. Об. X 40

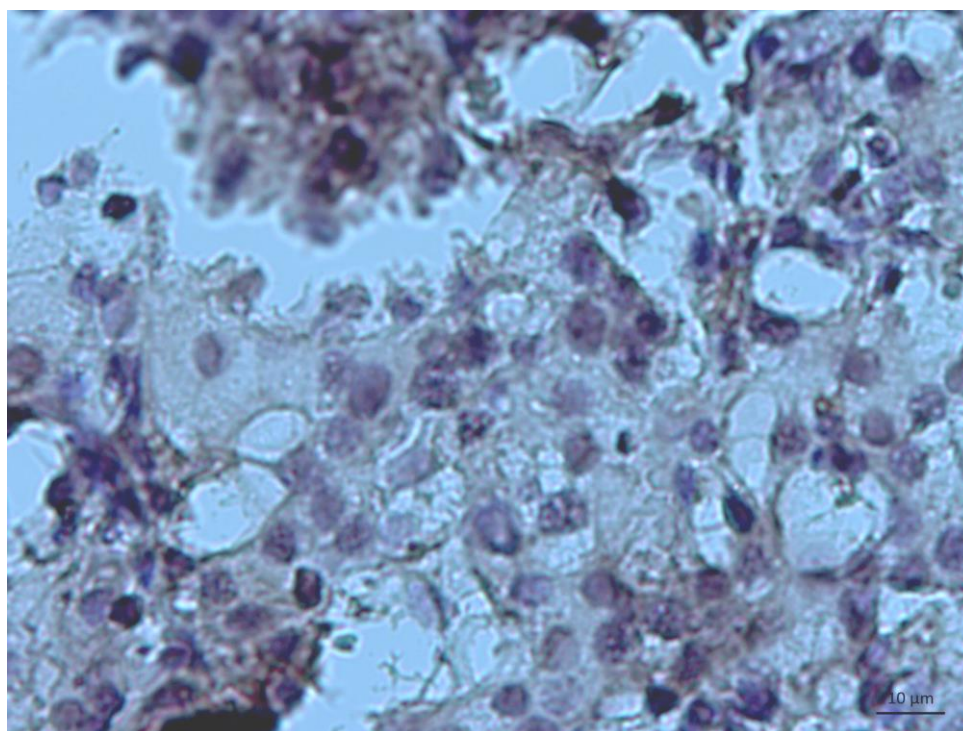


Рисунок 39. Эндокринная часть (островок) поджелудочной железы крысы СД+ZB-16 (1 мг/кг). Отсутствие цитоплазматической экспрессии каспаза-3 в эндокриноцитах. ИГХ с АТ против каспаза-3. Об. X 40

При проведении иммуногистохимического исследования с использованием антител против инсулина выявлена умеренно выраженная экспрессия иммунореактивного материала, большая абсолютная и

относительная площади иммунореактивного материала, количество инсулин-позитивных β -эндокриноцитов в панкреатических островках во всех отделах железы по сравнению с значениями, зафиксированными в ткани животных, не получавших лечения.

При проведении иммуногистохимического исследования с использованием антител к белку Ki-67 (маркер пролиферации) в ткани животных, получавших соединение ZB-16 в дозе 0,1 мг/кг, отмечалось большее количество ядерной экспрессии иммунореактивного материала в мелких (предположительно камбиальных) клетках панкреатических островков и в единичных эндокриноцитах. Иммуногистохимическое исследование с использованием антител против каспаза-3 показало, что у некоторых животных, получавших соединение ZB-16 в дозе 0,1 мг/кг, отмечалось наличие единичных эндокриноцитов панкреатических островков с экспрессией иммунореактивного материала.

При морфометрическом исследовании была отмечена тенденция к увеличению абсолютной площади каспаза-3-позитивных эндокриноцитов на 51,1 % ($p > 0,05$) и значимое снижение относительной площади каспаза-3-позитивных эндокриноцитов в панкреатических островках по сравнению с контрольной группой (СД) на 3,4 % ($p < 0,001$) соответственно, что свидетельствует об уменьшении количества эндокриноцитов панкреатических островков в состоянии апоптоза при коррекции ZB-16 (0,1 мг/кг) по сравнению с контрольной группой (СД). В то же время значения относительной площади каспаза-3-позитивных эндокриноцитов в панкреатических островках были сопоставимы с значениями, зафиксированными в тканях животных, не получавших лечения. Следует отметить значимое увеличение абсолютной площади каспаза-3-позитивных эндокриноцитов на 66,5 % ($p < 0,001$) по сравнению с интактной группой, что может отражать увеличение количества и/или размеров иммунореактивных эндокриноцитов при нормализации размеров островков.

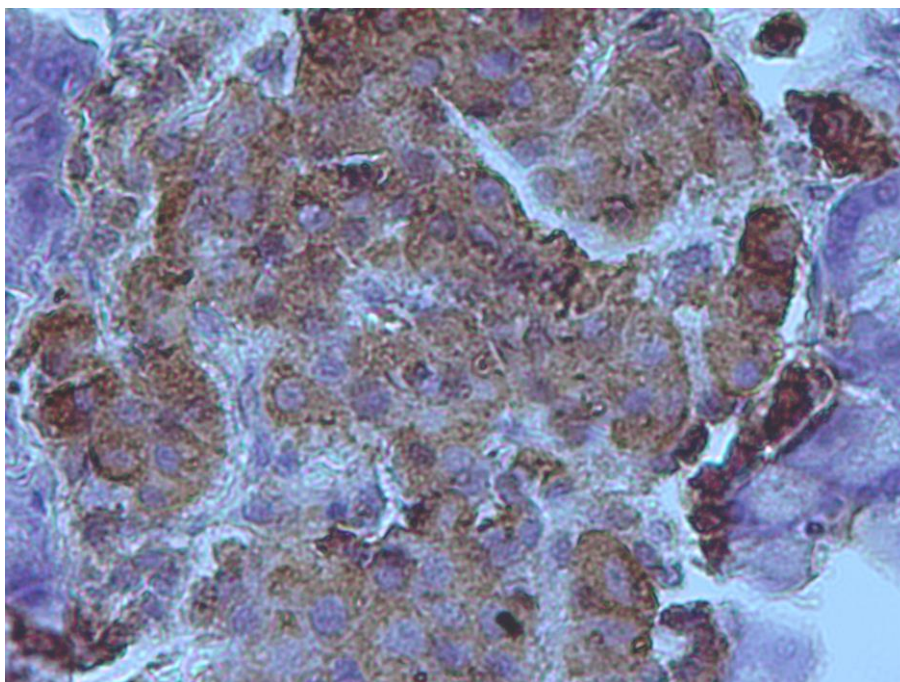


Рисунок 40. Эндокринная часть (островок) поджелудочной железы крысы СД+ZB-16 (0,1 мг/кг). ИГХ с АТ против инсулина. Об. X 40

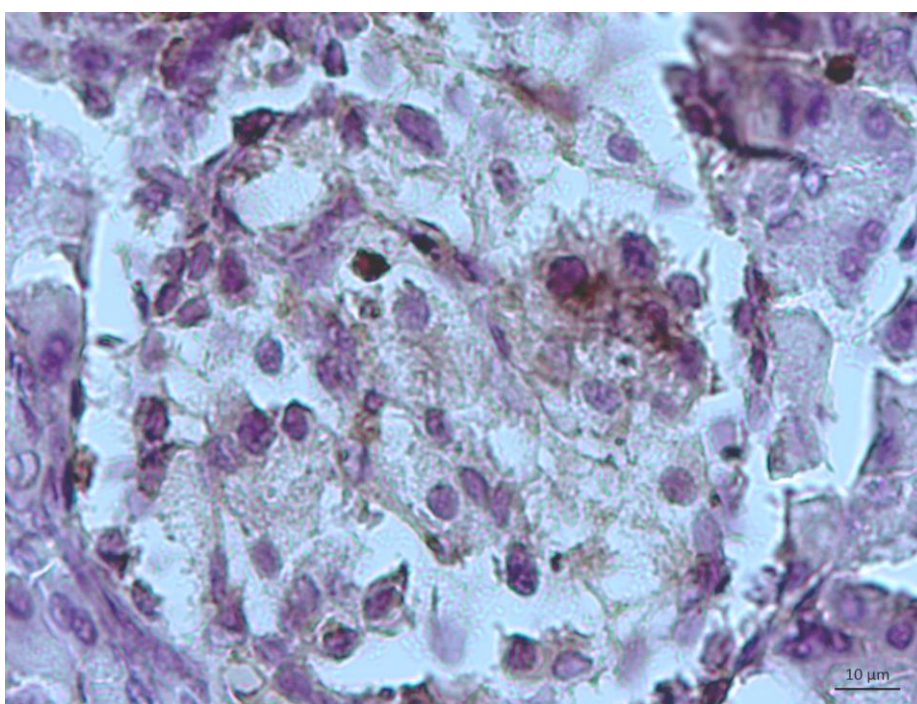


Рисунок 41. Эндокринная часть (островок) поджелудочной железы крысы СД+ZB-16 (0,1 мг/кг). ИГХ с АТ против Ki-67. Об. X 40

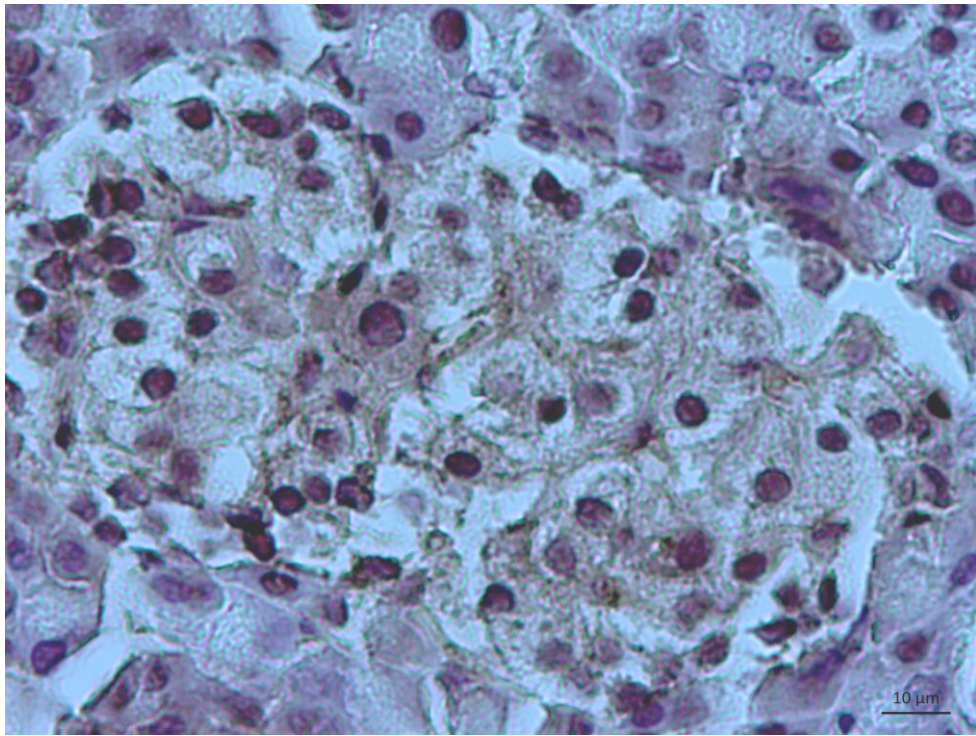


Рисунок 42. Эндокринная часть (островок) поджелудочной железы крысы СД+ZB-16 (0,1 мг/кг). ИГХ с АТ против каспаза-3. Об. X 40

Таким образом, морфологические изменения, обнаруженные в группе, получавшей плацебо, включают очаговую гиперемию поджелудочной железы (рис.43), связанную с фокальной лимфоидной инфильтрацией внутриполостной соединительной ткани или в некоторых случаях с интерстициальным отеком. Эндокринные клетки и их ядра были гипертрофированы. Окрестность островков поджелудочной железы частично инфильтрирована лимфоцитами. Островки поджелудочной железы имели неправильные формы и контуры, их размер и число резко уменьшались по сравнению с таковыми у интактной группы. Гипогликемическое действие ZB-16, описанное выше, может быть связано с частичным восстановлением β -клеток поджелудочной железы.

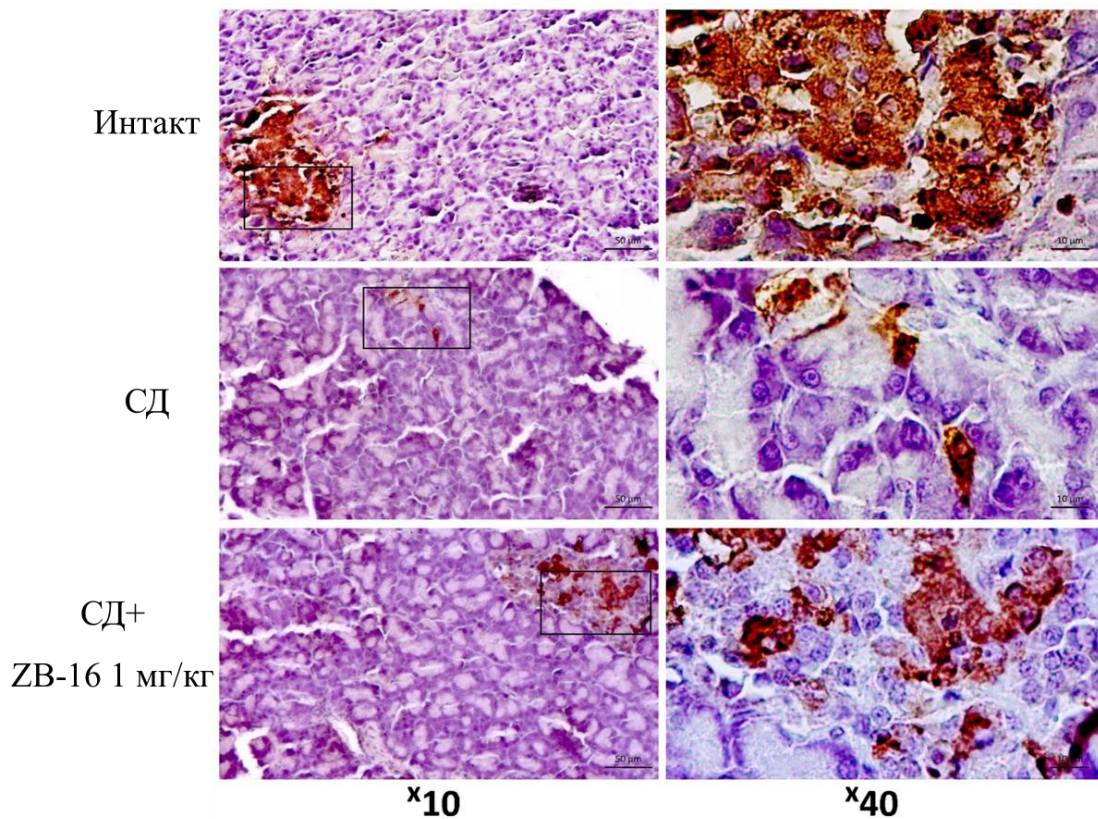


Рисунок 43. Обобщенные морфологические изменения в островках поджелудочной железы, окрашенных мышиными моноклональными антителами к инсулину с диаминобензидином в качестве хромогенного субстрата и дополнительной окраской с помощью гематоксилина в увеличении x10 и x40

Результаты морфометрического анализа, представленные на Рисунок 44, показывают, что размер и площадь островков поджелудочной железы у животных с экспериментальным СД значительно снижались по сравнению с интактной группой. Введение нового агониста GPR119 приводит к увеличению пролиферации и подавлению апоптоза в инсулинположительных эндокринных клетках, следствием чего, очевидно, является более интенсивное восстановление островков поджелудочной железы. Поскольку размер β -эндокринных клеток был сопоставим с размерами подобных клеток в контрольной группе, предполагается, что увеличение числа β -эндокринных клеток происходит из-за пролиферации и дифференциации камбиальных клеток, снижающих тяжесть атрофических изменений.

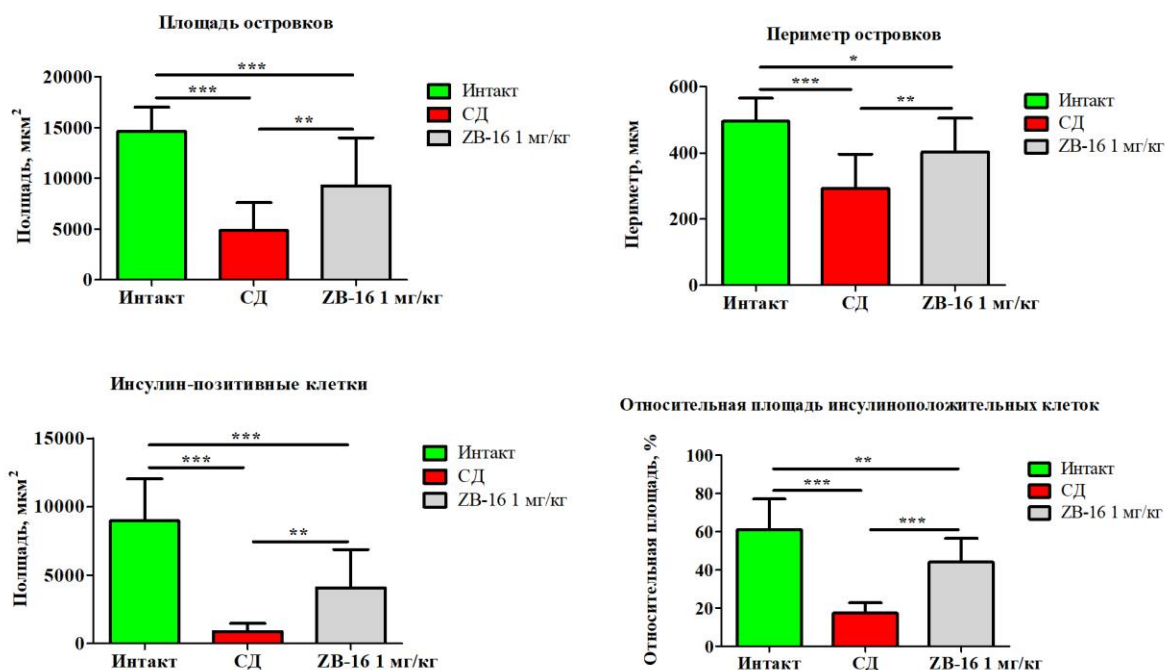


Рисунок 44. Обобщенные морфометрические данные изменений в островках поджелудочной железы

6.4 Заключение

Патогенетические механизмы, вызывающие СД2, являются комплексными и помимо нарушения утилизации глюкозы, инсулинрезистентности и повреждения инсулярного аппарата β -клеток поджелудочной железы включают и снижение инкретинового эффекта.

Известно, что инкретины стимулируют рост и дифференцировку β -клеток поджелудочной железы, влияя на аналогичные процессы в стволовых/прогениторных клетках, а также оказывают цитопротективное, антиапоптотическое воздействие на β -клетки.

В настоящем исследовании показано, что терапевтическое пероральное курсовое введение агониста GPR119 соединения ZB-16 повышает секрецию ГПП-1 и инсулина, оказывает выраженное гипогликемическое действие и подавляет секрецию глюкагона, а также оказывает защитное и/или репаративное действие на клетки поджелудочной железы крыс в условиях

никотинамид-стрептозотоцин-индуцированного СД. Так, на фоне его применения у животных наблюдается большая клеточная масса инсулинпозитивных и клеток, в которых активно идут процессы пролиферации и менее апоптоза. В предыдущих главах было показано, что соединение ZB-16 оказывает выраженное гипогликемическое действие, понижает аппетит и массу тела экспериментальных животных. Таким образом, соединение ZB-16 оказывает комплексное противодиабетическое действие, а спектр его эффектов в большей степени соответствует описываемым для инкретинов, что, учитывая его агонистическую активность в отношении рецептора, позволяет, с одной стороны, подтвердить участие GPR119 в регуляции секреции инкретинов, а с другой – доказать инкретинмиметический механизм действия нового агониста.

ГЛАВА 7. ИЗУЧЕНИЕ ПЛЕЙОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ АГОНИСТА GPR119

СД характеризуется множественными патофизиологическими процессами, основная часть которых происходит в эндокринной и сердечно-сосудистой системах. Гетерогенность этого заболевания определяет сложность его протекания и необходимость индивидуализации терапевтических вмешательств для каждого конкретного пациента. Вне зависимости от особенностей возникновения и развития СД в настоящее время выявлена четкая взаимосвязь нарушений углеводного обмена и эндотелиальной дисфункции, выражающаяся в неадекватной вазодилатации и/или парадоксальной вазоконстрикции (т.е. в извращении реакции эндотелия в ответ на стимулы эндотелиальной NO-синтазы) повышением атерогенного и прокоагуляционного потенциала. Наиболее уязвимыми мишенями при этом являются церебральные, коронарные и периферические артерии, что и объясняет высокую частоту возникновения цереброваскулярных осложнений у пациентов с СД [Мельникова Е.В., 2011; Чернов Ю.Н., 2010; Ярек-мартынова И.Р., 2004].

В последние годы многие ученые, занятые проблемой повышения эффективности лечения СД, пытаются решить проблему низкой эффективности профилактики цереброваскулярной патологии, возникающей на фоне СД, которая в значительной степени связана с эндотелиальной дисфункцией. Дисфункция эндотелия возникает в результате гипергликемии. В последующем она осложняет фармакотерапию СД, внося значительный вклад в механизмы, лежащие в основе формирования и нарастания инсулинрезистентности, которая, в свою очередь, также существенно ограничивает возможности фармакотерапии заболевания и усугубляет его течение. Снижение продукции NO эндотелием считается основным дефектом, связывающим инсулинорезистентность и эндотелиальную дисфункцию [DeFronzo R.A., 2015]. Дефицит NO является результатом

нарушения его синтеза и/или высвобождения, в сочетании с увеличенными продуктами реакционноспособного кислорода и других оксидов азота (в основном, пероксинитрита). Эндотелиальная дисфункция способствует нарушению действия инсулина, изменяя транскапиллярный проход инсулина в ткани-мишени, нарушает микроциркуляторный кровоток, и особенно в метаболически-активных тканях, что еще больше способствует нарушению метаболизма глюкозы. В результате, окислительный стресс повышает проницаемость эндотелия для липидов, что в совокупности с нарушением его эластичности способствует формированию атеросклеротической бляшки. Эти процессы также сопровождаются локальными воспалительными реакциями, высвобождением хемоаттрактантов и цитокинов, которые, в свою очередь, также ухудшают резистентность к инсулину и эндотелиальную дисфункцию [DeFronzo R. A., 2015].

Для эффективного лечения СД в настоящее время важно установить гликемический контроль, но не менее важно проводить терапию эндотелиальной дисфункции, тем более, если учесть продолжающиеся дискуссии об невозможности нормализации метаболизма углеводов в условиях нарушенной эндотелиальной функции [DeFronzo R.A., 2015].

Экспериментальные и клинические исследования свидетельствуют о перспективности использования препаратов, влияющих на систему инкретинов не только с точки зрения их гипогликемического действия, но и из-за способности корректировать эндотелиальную дисфункцию. Агонисты GPR119 при пероральном введении увеличивают секрецию инкретинов, что помимо основного – гипогликемического вызывает ряд свойственных им плеiotропных эффектов, в числе которых эндотелио- и церебропротективный.

7.1. Изучение плеiotропных эффектов соединения ZB-16 и его комбинации с метформином на модели острого нарушения мозгового кровообращения, воспроизведенной на фоне экспериментального СД***

Учитывая тот факт, что в клинических условиях одно заболевание неизбежно связано еще с несколькими, так или иначе усугубляющими (с точки зрения патогенеза и/или проводимой фармакотерапии) течение друг друга, целесообразным является подход к оценке действия разрабатываемого препарата в условиях моделирования сочетанной патологии, максимально близкой условиям клинической практики. В настоящем исследовании оценка эффективности нового агониста GPR119 и его комбинации с метформином проводилась при моделировании фокальной ишемии головного мозга у животных со никотинамид-стрептозотоцин-индуцированным СД. Схематичный дизайн исследования представлен на рис.45.

*** Исследование выполнено совместно с к.м.н. Д.А. Бакулиным, Е.О. Логвиновой.

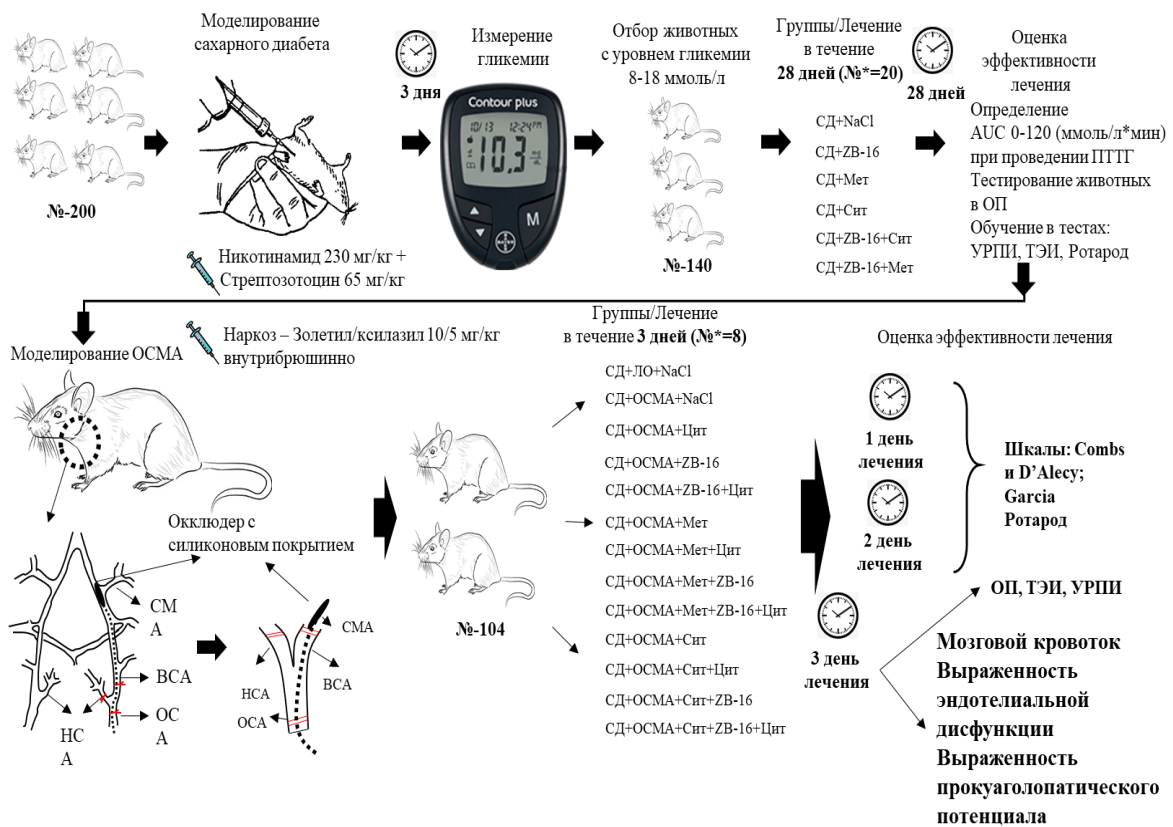


Рисунок 45. Дизайн исследования плеiotропного действия нового агониста GRP 119 соединения ZB-16 на модели ОСМА воспроизведенной на фоне ЭСД

Примечания: СД – сахарный диабет; ОП – открытое поле; УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания; ТЭИ – тест экстраполяционного избавления; ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии; НСА – наружная сонная артерия; СМА – средняя мозговая артерия; ВСА – внутренняя сонная артерия; ОСА – общая сонная артерия; NaCl – физиологический раствор; ЛО – ложная операция; ZB-16 – агонист GPR119; Цит – цитиколин; Мет – метформин; № – общее число животных; № – число животных в группе; интактная группа составляла 10 животных*

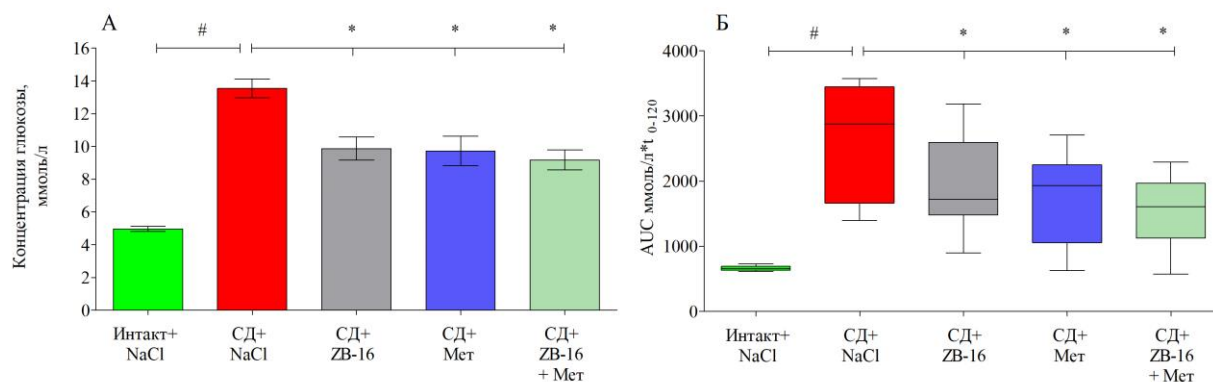


Рисунок 46. Результаты измерения концентрации глюкозы до и после проведения ПТТГ через 28 дней лечения после моделирования СД и лечебного введения исследуемого соединения, метформина и их комбинации

*Примечания: # - различия достоверны по отношению к группе интактных животных при $p < 0,05$; * - различия достоверны по отношению к группе СД+NaCl при $p < 0,05$*

Внутрибрюшинное введение стрептозотоцина через 15 минут после никотинамида привело к развитию у животных выраженной гипергликемии натощак и снижению скорости утилизации глюкозы. После 28 дней терапевтического введения агониста GPR119, метформина и их комбинации скорость утилизации глюкозы, измеренная в ходе проведения ПТТГ, была достоверно ($p < 0,05$) выше, чем у животных группы, не получавшей «лечения», но также значительно уступала зафиксированной у интактных (рис.46). Таким образом, несмотря на достоверные отличия в скорости утилизации глюкозы от значений группы животных, не получавших «лечения», можно сказать, что все крысы (за исключением интактных) имеют выраженные нарушения углеводного обмена. Согласно цели экспериментального исследования в дальнейшем мы смоделировали у этих животных фокальную ишемию головного мозга путем временного (на 30 минут) введения монофиламента до средней мозговой артерии. Аналогичное по технике и времени введение филамента в артерии интактных животных не вызывало у них выраженных явлений неврологического дефицита и некроза

мозговой ткани, что более подробно описано в нашей предыдущей работе [Бакулин Д.А., 2016]. Поэтому в настоящем исследовании дальнейшее сравнение показателей животных велось только между группами, у которых моделировался СД.

Группа животных, у которых был смоделирован СД (СД+NaCl, №=30), по принципу рандомизации была разделена на три равные группы, двум из которых была произведена ОСМА (СД+ОСМА+NaCl и СД+ОСМА+Цит) и 1 перевязана левая ОСА (СД+ЛО+NaCl). Из остальных животных с СД были также сформированы равные группы, по 10 животных в каждой, у которых была произведена ОСМА, продолжили вводить соединение ZB-16, метформин, их комбинацию и с церебропротективным препаратом – цитиколин.

Через 24 и 48 часов после оперативного вмешательства (ОСМА или ЛО) регистрировался неврологический дефицит в баллах по двум шкалам (Combs и D'Alecy и Garcia). Минимальные нарушения отмечались в группе ЛО животных ($8,1 \pm 0,4$ и $8,3 \pm 0,2$ балла по шкале Combs и D'Alecy; $17,3 \pm 0,3$ и $17,8 \pm 0,2$ балла по шкале Garcia на 24 и 48 час соответственно), а максимальные у тех, которым после операции вводили физиологический раствор ($3,1 \pm 0,8$ и $3,3 \pm 0,9$ балла; $7,4 \pm 1,7$ и $8,1 \pm 1,6$ балла соответственно) или цитиколин ($3,1 \pm 0,6$ и $3,9 \pm 0,6$ балла; $9,7 \pm 1,7$ и $11,8 \pm 2,1$ балла соответственно; рис.47А и Б). У животных, которым терапевтически вводили соединение ZB-16 и метформин, симптомы неврологического дефицита были несколько менее тяжелыми, чем у животных, получавших физиологический раствор или цитиколин. Комбинированная терапия соединением ZB-16 и метформинном оказывала более выраженное церебропротективное действие, чем каждое вещество в отдельности ($5,7 \pm 0,8$ балла по шкале Combs и D'Alecy; $13,9 \pm 1,1$ балла по шкале Garcia; $p < 0,05$) и способствовало более быстрому регрессу симптомов психоневрологического дефицита (через 48 часов после операции баллы составили $6,5 \pm 0,9$ и $15,8 \pm 0,7$ соответственно;

$p < 0,05$). Комбинирование и ZB-16, и метформина с цитиколином не приводило к существенному увеличению церебропротекторного действия.

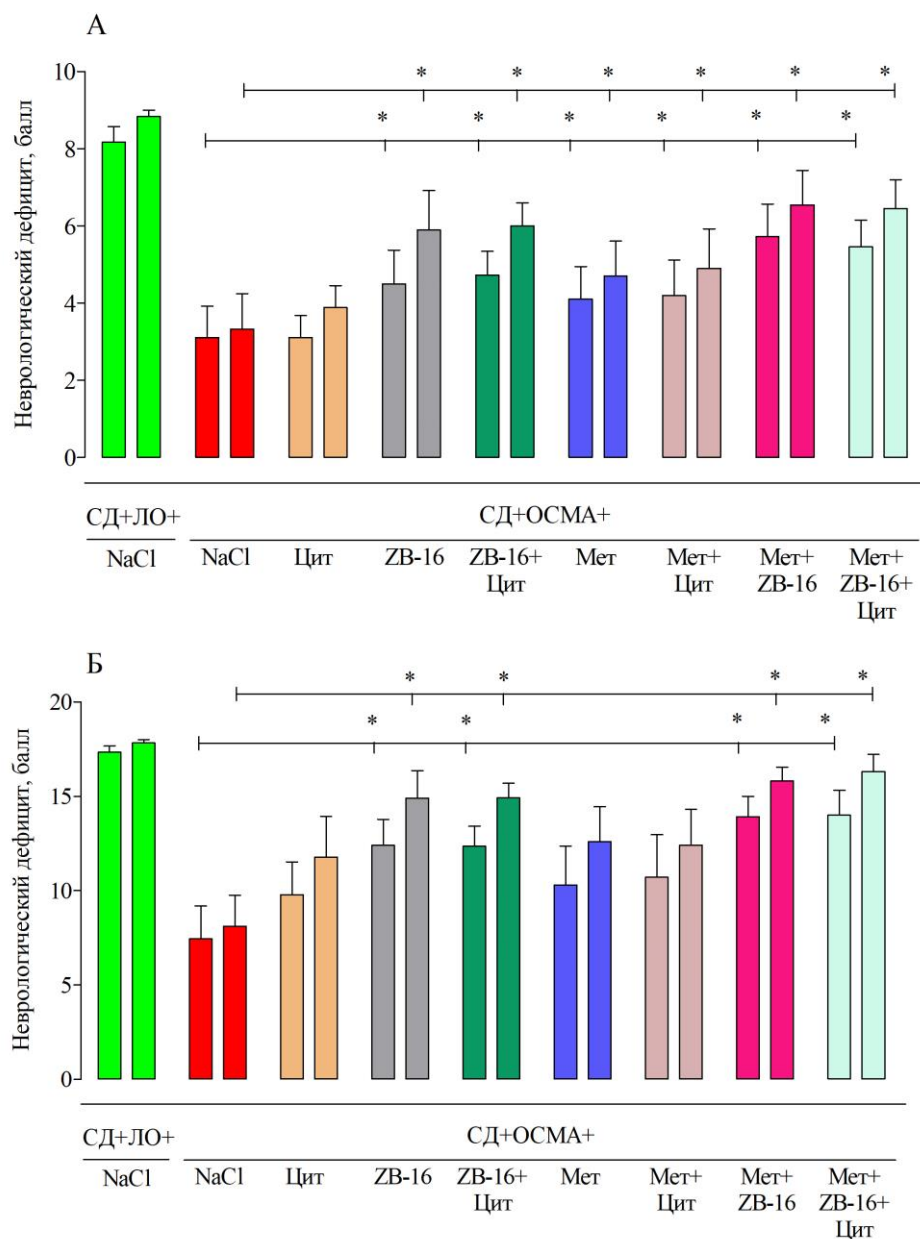


Рисунок 47. Выраженность нейропротективного действия исследуемого соединения, метформина, цитиколина и их комбинации (в баллах) по шкалам Combs и D'Alecy (А) и Garcia (Б) через 24 и 48 часов после моделирования ОСМА

Примечания: # - различия достоверны по отношению к группе СД+ЛО+NaCl при $p < 0,05$; * - различия достоверны по отношению к группе СД+ОСМА+NaCl при $p < 0,05$

Использование теста «Ротарод», отражающего силу и координацию животных по времени их удержания на вращающемся стержне установки,

показало, что более высокие показатели были у животных, получавших агонист GPR119, чем у животных, получавших метформин, и еще более значимо, чем у тех, которым вводили цитиколин.

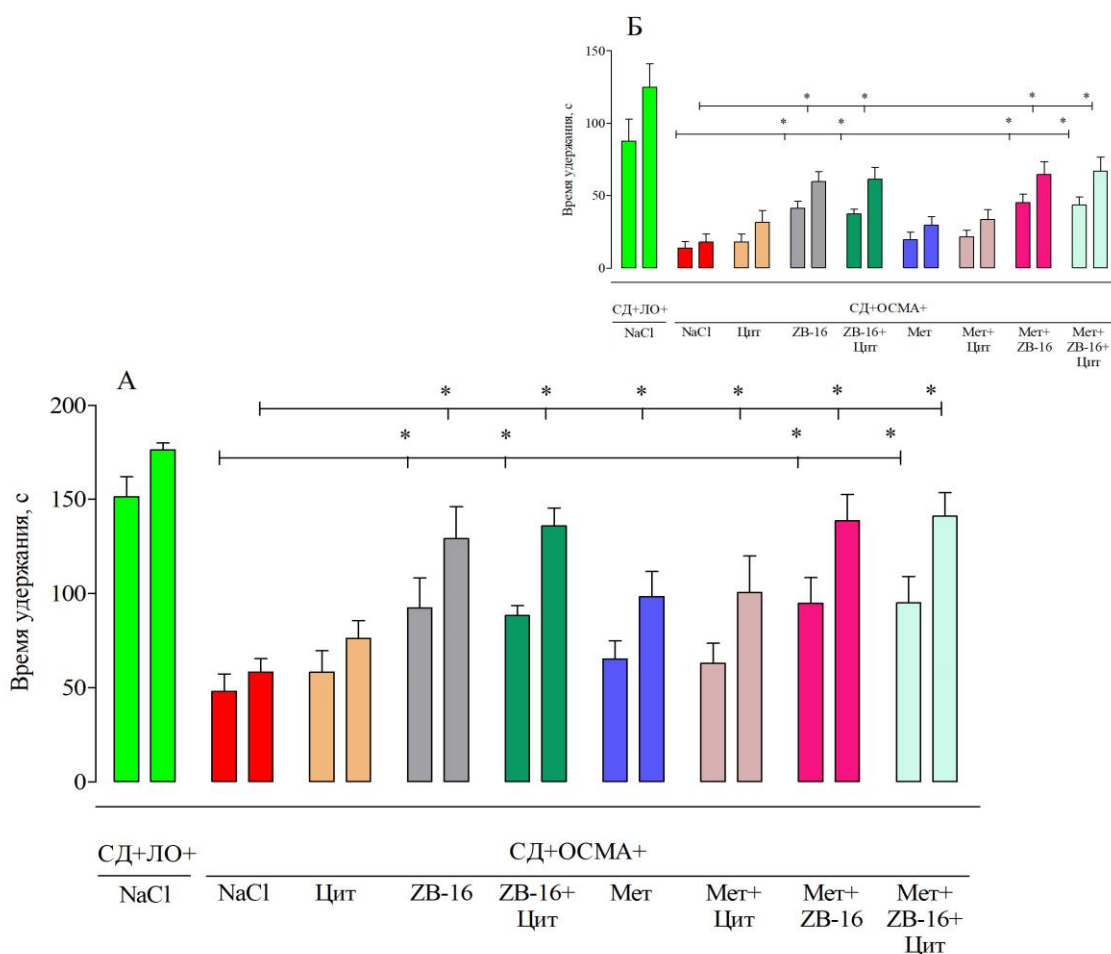


Рисунок 48. Общее время удержания (А) и латентный период первого падения (Б) животных на вращающемся стержне установки Ротарод у животных через 24 и 48 часов после моделирования ОСМА, получавших исследуемое вещество, метформин, цитиколин и их комбинации

Комбинирование ZB-16 с цитиколином и метформина с цитиколином приводило к усилению его нейропротективного эффекта через 24 часа, но не значительно большими оказались показатели, зарегистрированные через 48 часов. При сочетанном применении метформина и цитиколина продолжительность удержания на вращающемся стержне было таким же, как у животных, получавших только метформин. А комбинирование ZB-16 с

метформином привело к небольшому увеличению нейропротективного действия агониста GPR119. Добавление к этой комбинации цитиколина никак не повлияло на физическую выносливость и координацию движений животных с ОСМА, воспроизведенной на фоне экспериментального СД (рис.48).

Тестирование контрольной группы животных с ОСМА и экспериментальным СД в «Открытом поле» показало, что те, кто получали физиологический раствор, меньше двигались (пересекали меньшее число секторов) и меньше совершали актов, свидетельствующих об уровне ориентировочно-исследовательской (суммарное количество заглядываний в отверстия установки и вставания на задние лапы (с опорой или без)) активности по сравнению с интактными (рис.49). У животных, которые до и после ОСМА получали соединение ZB-16 и, в меньшей степени, метформин, показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности были статистически значимо выше, чем в группе негативного контроля. Поведение животных, которым вводился цитиколин, в тесте «Открытое поле», а именно число поведенческих актов было лишь незначительно выше, чем у группы негативного контроля. Добавление цитиколина к терапии соединением ZB-16 и метформина животным с ОСМА и экспериментальным СД не повлияло на активность их поведения в «ОП», т.е. в условиях ситуативной тревожности (рис.49).

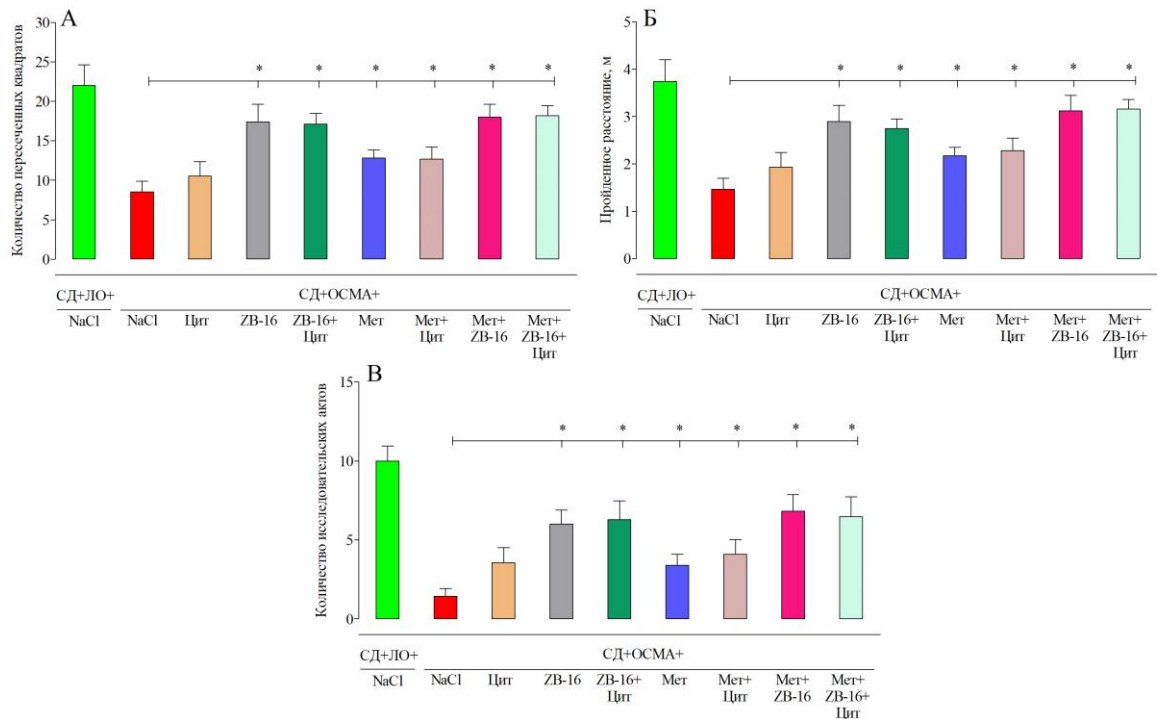


Рисунок 49. Двигательная (А, Б) и ориентировочно-исследовательская (В) активность в тесте «Открытое поле» у животных через 72 часа после моделирования ОСМА и лечебного введения исследуемого соединения, метформина и их комбинации

При оценке когнитивной функции у животных с ОСМА и экспериментальным СД с помощью тестов УРПИ и ТЭИ было отмечено значительно меньшее время захода в темный отсек и большее время подныривания (избавления от аверсивной среды), чем у интактных, что свидетельствует об ухудшении сохранения памятного следа и решении задачи экстраполяционного избавления.

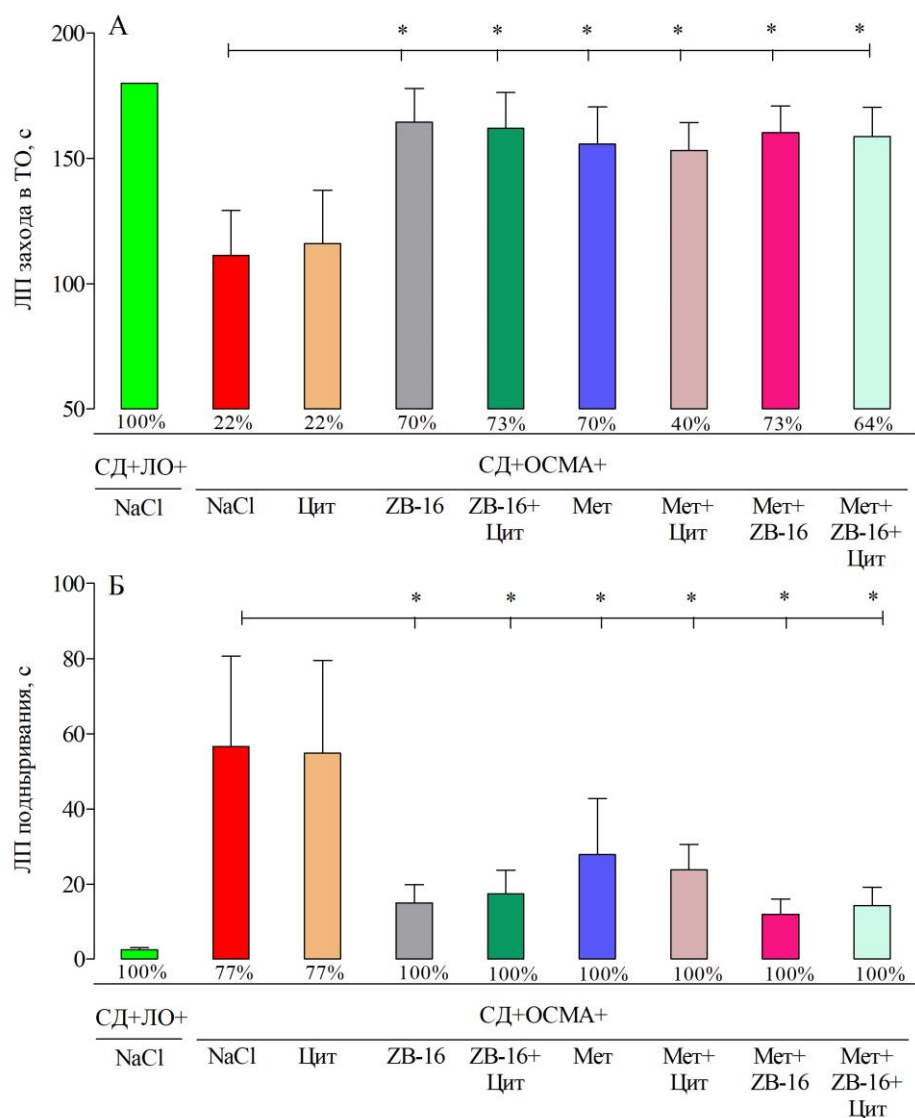


Рисунок 50. Время захода в темный отсек установки «УРПИ» (А, % доля животных, не зашедших в отсек) и подныривания в «ТЭИ» (Б, % доля животных, решивших экстраполяционную задачу) животных через 72 часа после моделирования ОСМА и лечебного введения исследуемого соединения, метформина и их комбинации

В то же время у животных, которым после операции продолжили вводить соединение ZB-16 и метформин, показатели когнитивной функции оказались значительно лучше, чем у животных негативного контроля, а у животных, получавших цитиколин, эти показатели были сопоставимы с группой контроля (рис.50). Комбинирование ZB-16 с цитиколином,

метформинном и одновременно с цитиколином и метформинном не влияло на церебропротективное действие агониста GPR119.

Таким образом, терапевтическое введение церебропротекторного средства цитиколин животным, у которых ОСМА была смоделирована на фоне 4-недельного СД, не приводило к значимому ограничению (регистрация на 24 час после операции) или снижению (через 48 часов после операции) тяжести психоневрологического дефицита. В то же время в группах животные, которые с начала эксперимента получали соединение ZB-16, метформин или их комбинацию, а затем после моделирования ОСМА и цитиколин, показатели психоневрологического дефицита практически не отличались от таковых, в которых церебропротекторный препарат заменяли физиологическим раствором. Очевидно, это связано с тем, что на фоне СД развивается ряд нарушений в функционировании нервной и сердечно-сосудистой системах, тяжесть которых зависит от величины и длительности гипергликемии и наличие которых в значительной степени усугубили последствия ОСМА и снизили эффективность цитиколина. Экспериментальные группы, животные которых получали гипогликемическую терапию, легче переносили 30-минутную ОСМА, и регресс психоневрологического дефицита через 48 часов после операции у них был более заметен. В настоящем исследовании также было обнаружено, что метформин сопоставимо с соединением ZB-16 компенсировал нарушения углеводного обмена, однако после моделирования ОСМА психоневрологическое состояние этих животных было хуже и через 24, и через 48 часов наблюдения. В то же время введение после ОСМА цитиколина животным, которые на протяжении всего эксперимента получали метформин, привело к тому, что их показатели были несколько лучше, чем аналогичная группа без церебропротектора, но хуже, чем у животных, которые получали только ZB-16 (без цитиколина).

Мозговой кровоток (МК), регистрируемый игольчатым датчиком лазерного доплерографа в проекции средней мозговой артерии, у животных,

перенесших ОСМА, был ниже, чем ЛО (группа СД+ЛО+NaCl). Минимальные значения МК регистрировались в группах животных с СД и ОСМА и в течение 3 дней получавших физиологический раствор или цитиколин. У животных, которым после моделирования ОСМА перорально вводили соединение ZB-16, метформин или их комбинацию, значения МК были достоверно выше, чем в группе, получавшей физиологический раствор. При этом добавление к терапии церебропротекторного препарата цитиколин не приводило к значимому повышению МК (рис.51А).

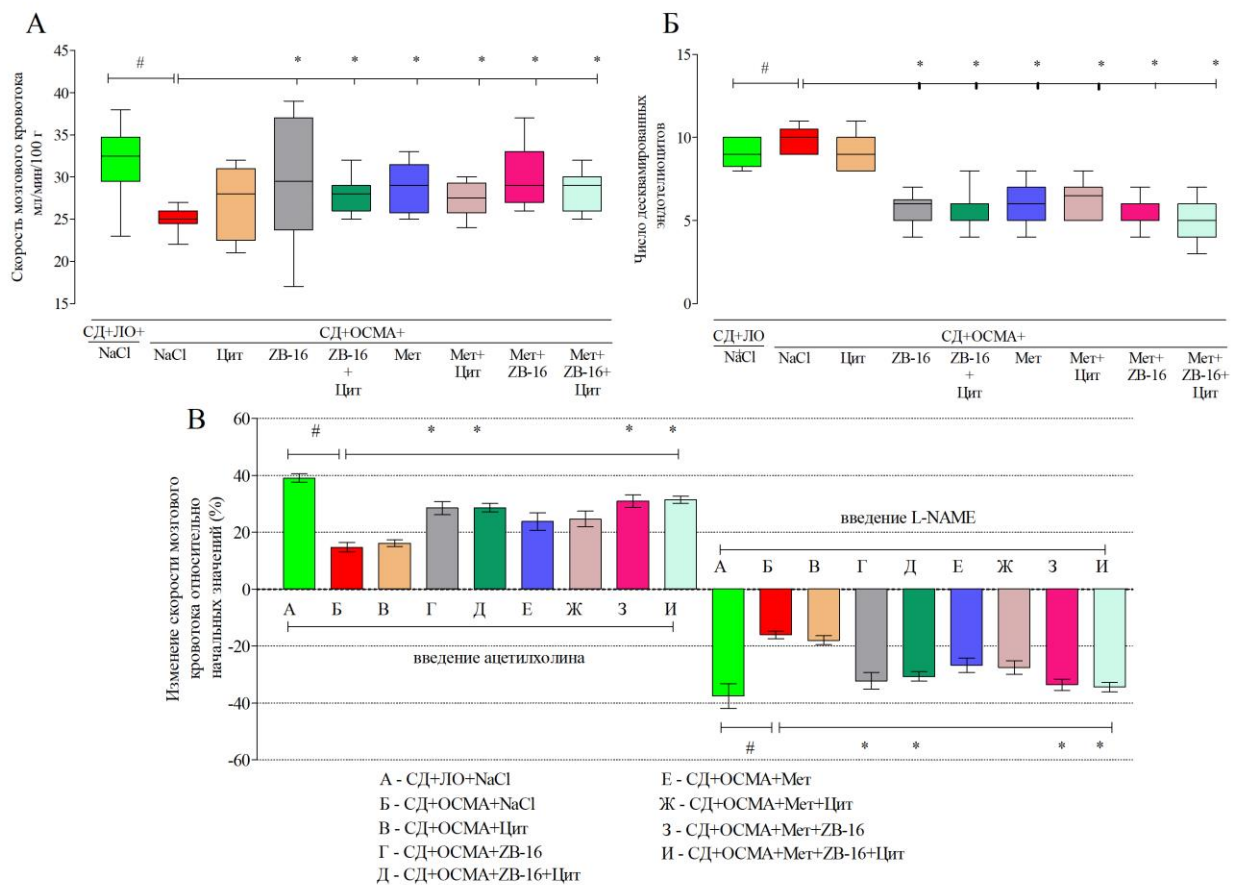


Рисунок 51. Мозговой кровоток (А), число десквамированных эндотелиоцитов (Б) и изменение мозгового кровотока в ответ на введение модификаторов синтеза оксида азота (В) через 72 часа после моделирования ОСМА и лечебного введения исследуемого соединения, метформина, цитиколина и их комбинации

Количество десквамированных эндотелиальных клеток является общепризнанным маркером повреждения эндотелия [Wu H., 2007]. Анализ

артериальной крови показал, что большее их количество было у животных с экспериментальным СД, которые не получали, предшествующей ОСМА, гипогликемической терапии (СД+ЛО+NaCl, СД+ОСМА+NaCl, СД+ОСМА+Цит). Напротив, у животных, которым вводили соединение ZB-16, метформин и их комбинацию, с цитиколином или без, нарушения углеводного обмена были выражены меньше, число десквамированных эндотелиоцитов также было достоверно меньше (рис.51Б).

При оценке функциональной активности эндотелия, а именно стимулированной (ацетилхолином) и базальной (при введении L-NAME) секреции NO, было отмечено, что менее выраженные сосудистые реакции наблюдались у животных, которым в течение 3 дней вводили физиологический раствор или цитиколин. В группе ЛО животных отмечались максимально выраженные сосудистые реакции в ответ на стимулирование и блокаду eNOS, что обеспечивает более высокий мозговой кровоток и свидетельствует о меньшей выраженности эндотелиальной дисфункции. Сосудистые реакции животных, которые получали соединение ZB-16, его комбинации с метформином и/или цитиколином, были более выражены, чем в контрольной группе, и превосходили отмеченные в группах, получавших метформин и его комбинацию с цитиколином (рис.51В).

В настоящее время установлено, что важную роль в развитии эндотелиальной дисфункции при СД отводят развитию оксидативного стресса [Аметов А.С., 2016; Касаткина С.Г., 2011; Потемкин В.В., 2015]. Так при гипергликемии такие процессы как аутоокисление глюкозы, перекисное окисление липидов, активация индуцибельной NO-синтазы способствуют избыточному образованию свободных радикалов – молекул, обычно содержащих атом кислорода с непарным электроном и обладающих высокой реагентной способностью [Ghosh, S., 2015; Pitocco D., 2010]. Поскольку при СД активность собственных антиоксидантных систем снижена, что совместно с избытком образования свободных радикалов, ведет к развитию

оксидативного стресса [El-Sahar A.E., 2015; Wiernsperger N.F., 2003; Kitasato L., 2012; Xu J., 2009]. В дополнение к этому отмечается снижение выработки NO – базового фактора антиатерогенеза, который противостоит формированию атеросклеротической бляшки на всех этапах. Доказано, что оксидативный стресс ведет к нарушению нормального функционирования эндотелия, что вызывает уменьшение выработки NO, увеличение выработки адгезивных молекул, вазоконстрикторов и других факторов, которые затем приводят к воспалению, тромбозу, поражению сосудистой стенки [Pitocco D., 2010; Булаева Н.И., 2013]. Супероксид-ион реагирует с NO, при этом образуется пероксинитрит (ONOO), который не является вазодилататором, но цитотоксичен и усиливает повреждающее действие продуктов свободно-радикального окисления. К тому же NO полагают, является одной из биохимических субстанций, которая при повышении концентрации глюкозы в крови вызывает высвобождение инсулина и увеличение потребления глюкозы тканями [Слиецанс А.А., 2010; El-Remessy A.B., 2010]. Поэтому мы посчитали целесообразным оценить содержание продуктов перекисного окисления, а именно реагирующих с ТБК, концентрация которых отражает интенсивность процессов ПОЛ, повышение которой отмечается при гипергликемии. Так, их концентрация была выше у животных, которым моделировали СД без последующей ОСМА (группа СД+ЛО+NaCl) или с ней (группа СД+ОСМА+NaCl, СД+ОСМА+Цит) и которые не получали гипогликемическую терапию. Фокальная ишемия головного мозга, очевидно еще в большей степени, усилила оксидативный стресс, поскольку концентрация ТБК-активных продуктов у животных этих групп (СД+ОСМА+NaCl, СД+ОСМА+Цит) была максимальной. В тех группах, которые получали соединение ZB-16, его комбинацию с метформином или цитиколином, но не метформин в отдельности, концентрация ТБК-активных продуктов была достоверно ниже, чем в контрольной группе, что свидетельствует о меньшей интенсивности ПОЛ и соответственно о меньшем проявлении оксидативного стресса (рис.52).

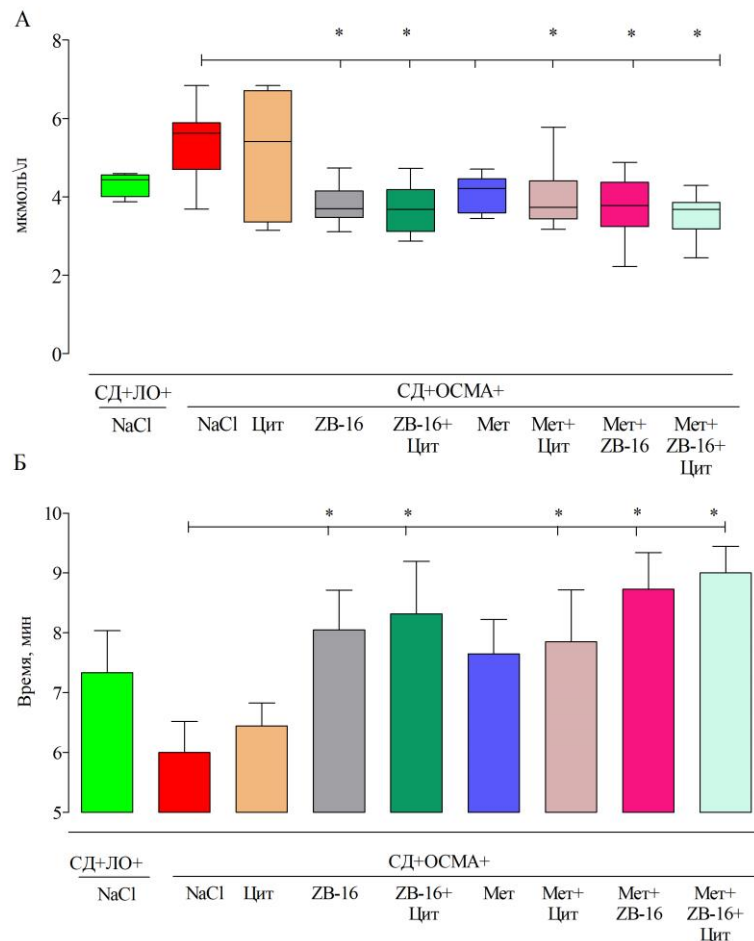


Рисунок 52. Концентрация продуктов, прореагировавших с ТБК (А) и продолжительность кислотного гемолиза эритроцитов (Б) у животных после моделирования ОСМА и лечебного введения исследуемого соединения, метформина, цитиколина и их комбинации

Косвенным показателем длительности и интенсивности оксидативного стресса является поврежденность клеточных мембран, оценить которую возможно при анализе ее устойчивости к действию агрессивных внешних факторов [Рабаданова А.И., 2013]. В настоящем исследовании мы оценивали скорость разрушения мембран эритроцитов при помещении их в кислую среду. Чем быстрее протекал гемолиз, тем более поврежденной была мембрана эритроцита и тем тяжелее был оксидативный стресс, вызванный СД и последующей ОСМА. Наиболее выраженные изменения были отмечены у животных, перенесших ОСМА на фоне СД, гемолиз эритроцитов у них происходил в максимально короткие сроки, тогда как у животных,

получавших ZB-16 или его комбинацию с цитиколином и/или метформином, устойчивость эритроцитов повышалась, о чем свидетельствовал более продолжительный период гемолиза, что также косвенно указывает на менее выраженный оксидативный стресс у этих животных (рис.52Б).

При СД и развитии эндотелиальной дисфункции наблюдаются изменения в системе гемостаза, сдвиг потенциала на тромбогенный, прокоагулянтный. В системе гемостаза принимают участие факторы свертывающей, противосвертывающей (антикоагулянтной) и фибринолитической систем крови. Изменение функционального состояния одной из систем сопровождается компенсаторными сдвигами в деятельности другой [Грицай Н. Н., 2006; Северина А.С., 2004; Хасанова Ю.В., 2013]. В связи с чем на следующем этапе было изучено действие агониста GPR119 и его комбинации с метформином и цитиколином на основные показатели плазменного гемостаза животных на фоне СД и ОСМА.

У экспериментальных животных с воспроизведенной на фоне СД и ОСМА отмечались выраженные нарушения плазменного гемостаза. Так, у животных негативной контрольной группы и тех, которым вводили цитиколин, и группы ЛО животных (с СД, но без ишемии) было отмечено укорочение длительности АЧТВ, ПВ и ТВ, а также более высокая концентрация фибриногена. В то же время у получавших соединение ZB-16, метформин (менее выражено) и их комбинацию, указанные выше показатели плазменного гемостаза достоверно отличались от таковых в группах, не получавших предшествующей ОСМА гипогликемической терапии (рис.53).

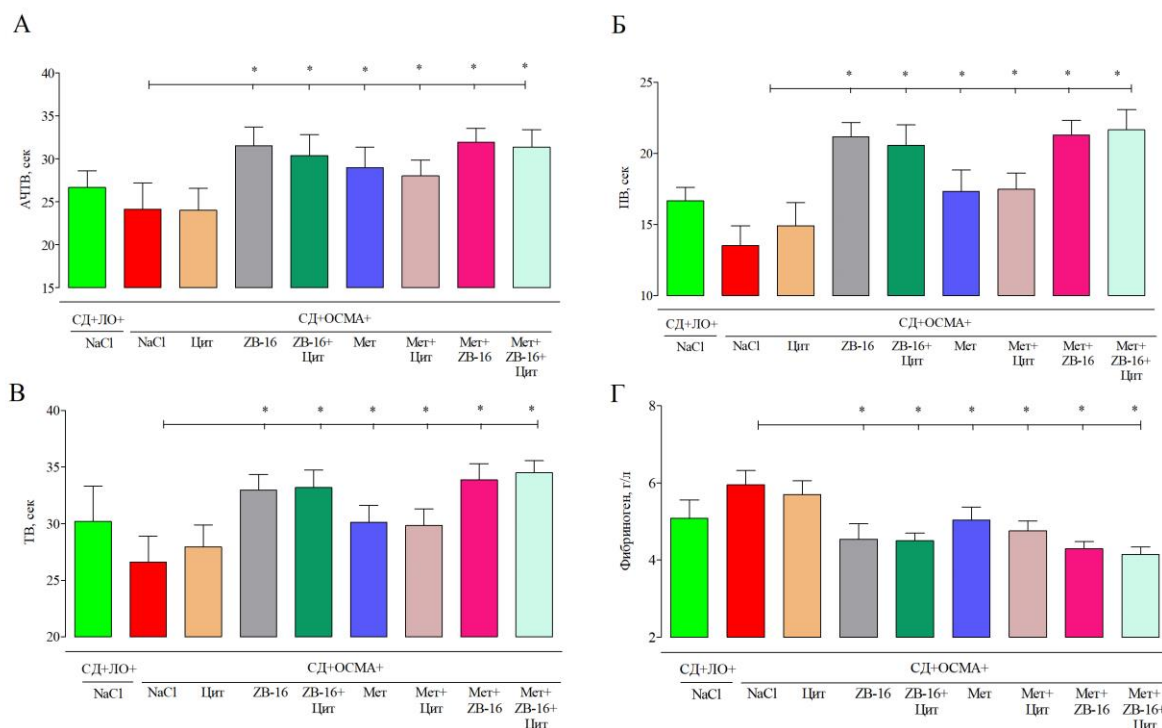


Рисунок 53. Влияние лечебного введения исследуемого соединения, метформина, цитиколина и их комбинации на длительность АЧТВ (А), ПВ (Б), ТВ (В) и концентрация фибриногена (Г) у животных с СД и после моделирования ОСМА

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

повреждение клеточных мембран и нарушения плазменного гемостаза были более выраженными, что, очевидно, является причиной сравнительно более тяжелого течения ОСМА и большей зоны некроза мозговой ткани (рис.54).

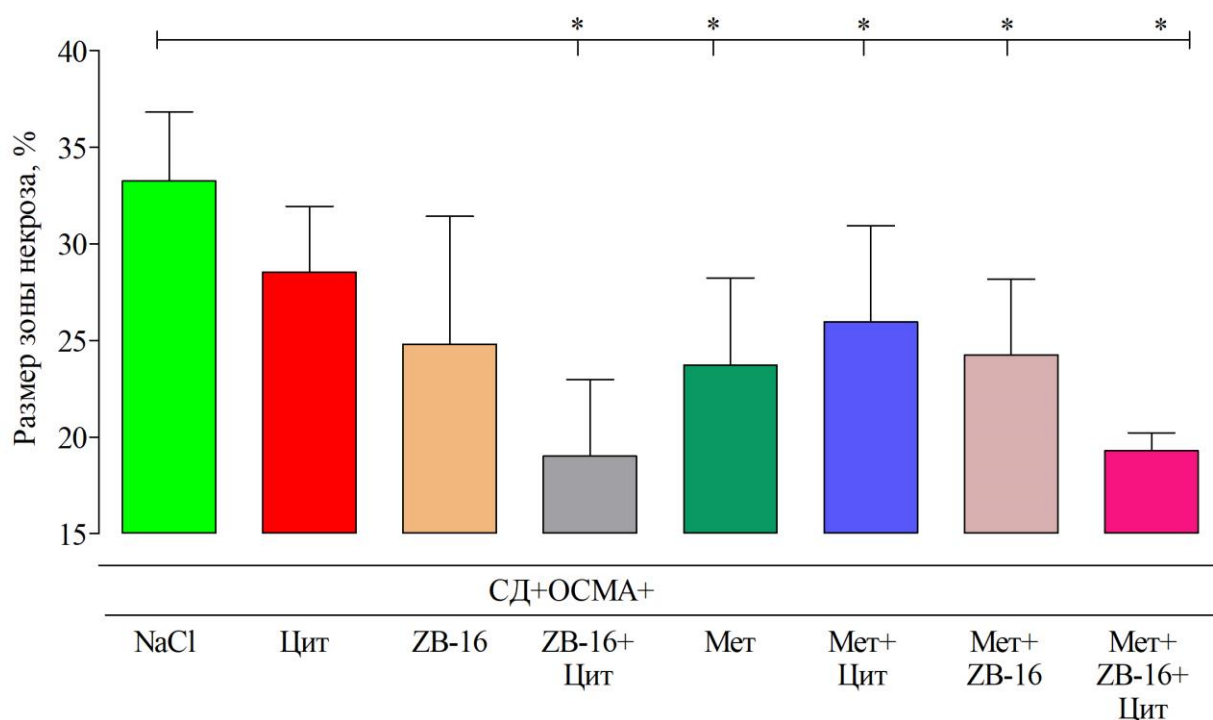


Рисунок 54. Влияние лечебного введения исследуемого соединения, метформина, цитиколина и их комбинации на размер зоны некроза мозговой ткани у животных через 72 часа после моделирования ОСМА

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что меньшие, чем в группе ЛО животных, значения скорости мозгового кровотока после 30-минутной ОСМА могут быть частично объяснены более интенсивным протеканием процессов постреперфузионного тромбообразования, о чем косвенно свидетельствуют отмеченные нарушения плазменного гемостаза и большие размеры зоны некроза мозговой ткани. Сниженная реакция эндотелия на активацию eNOS ацетилхолином свидетельствует о низкой стимулированной секреции оксида азота, как основного вазодилатирующего фактора, а меньший вазоконстрикторный эффект L-NAME – о сниженной его базальной продукции. Оксидативный стресс и низкая устойчивость клеточных мембран к кислотному гемолизу также, очевидно, являются, с одной стороны, маркерами эндотелиальной

дисфункции, с другой – ее причиной и следствием. В результате проведенного исследования отмечено, что проявления эндотелиальной дисфункции, оксидативного стресса, состояния клеточных мембран, нарушения плазменного гемостаза и, в конечном итоге, размер зоны некроза мозговой ткани были более выраженными у животных, которые не получали предшествующей ОСМА гипогликемической терапии. Пероральное применение соединения ZB-16, метформина и их комбинации в значительной степени компенсировало нарушения углеводного обмена, снижая гипергликемию натощак и увеличивая скорость утилизации глюкозы при проведении ПТТГ. Проявления эндотелиальной дисфункции, оксидативного стресса, нарушений в плазменном гемостазе и повреждение клеточных мембран, а также зона некроза мозговой ткани после ОСМА были меньше. Дополнительное после моделирования ОСМА введение цитиколина практически не повышало эффективность проводимой ранее гипогликемической терапии. Пероральное на фоне СД введение метформина и еще в большей степени его комбинации с ZB-16 выраженнее, чем только ZB-16, компенсировало нарушения углеводного обмена, но данные, свидетельствующие об эндотелиальной дисфункции, состоянии клеточных мембран, оксидативном стрессе и нарушениях плазменного гемостаза у этих животных были хуже, чем у получавших ZB-16. Подобная ситуация может быть следствием наличия плеiotропных эффектов, свойственных препаратам, влияющим на инкретиновую систему, среди которых имеет место выраженное церебро- и эндотелиопротективное действие.

Использование одного препарата для установления эффективного контроля гипергликемии не всегда эффективно и не приводит к положительным результатам, а зачастую оказывает обратный эффект, усугубляя состояние пациента, из-за незаметного прогрессирования болезни в отсутствии адекватной терапии. Поэтому проводимая у больных терапия СД должна не только обеспечивать эффективный контроль гликемии, но и

предупреждать развитие сердечно-сосудистых осложнений, включая церебро- и эндотелиопротективное действие.

Соединение ZB-16 обладает не только гипогликемическим действием, сопоставимым с таковым у препарата сравнения метформин, но и оказывает более выраженное, чем он, церебро- и эндотелиопротективное действие, усиливающееся при их комбинированном введении.

7.2. Изучение плеiotропных эффектов соединения ZB-16 и его комбинации с метформином на модели хронического нарушения мозгового кровообращения, воспроизведенной на фоне экспериментального СД^{†††}

Учитывая длительный период бессимптомного течения СД и параллельных с ним процессов, обуславливающих возникновение эндотелиальной дисфункции, развитие микро- и макроангиопатий, а также наличие церебропротективных свойств, представлялось целесообразным оценить плеiotропные эффекты этого соединения ZB-16 и его комбинаций с метформином и ситаглиптином в условиях хронического нарушения мозгового кровообращения (ХНМК) и СД. Дизайн исследования представлен на рис.55.

^{†††} Исследование выполнено совместно с к.м.н. Д.А. Бакулиным, Е.О. Логвиновой.

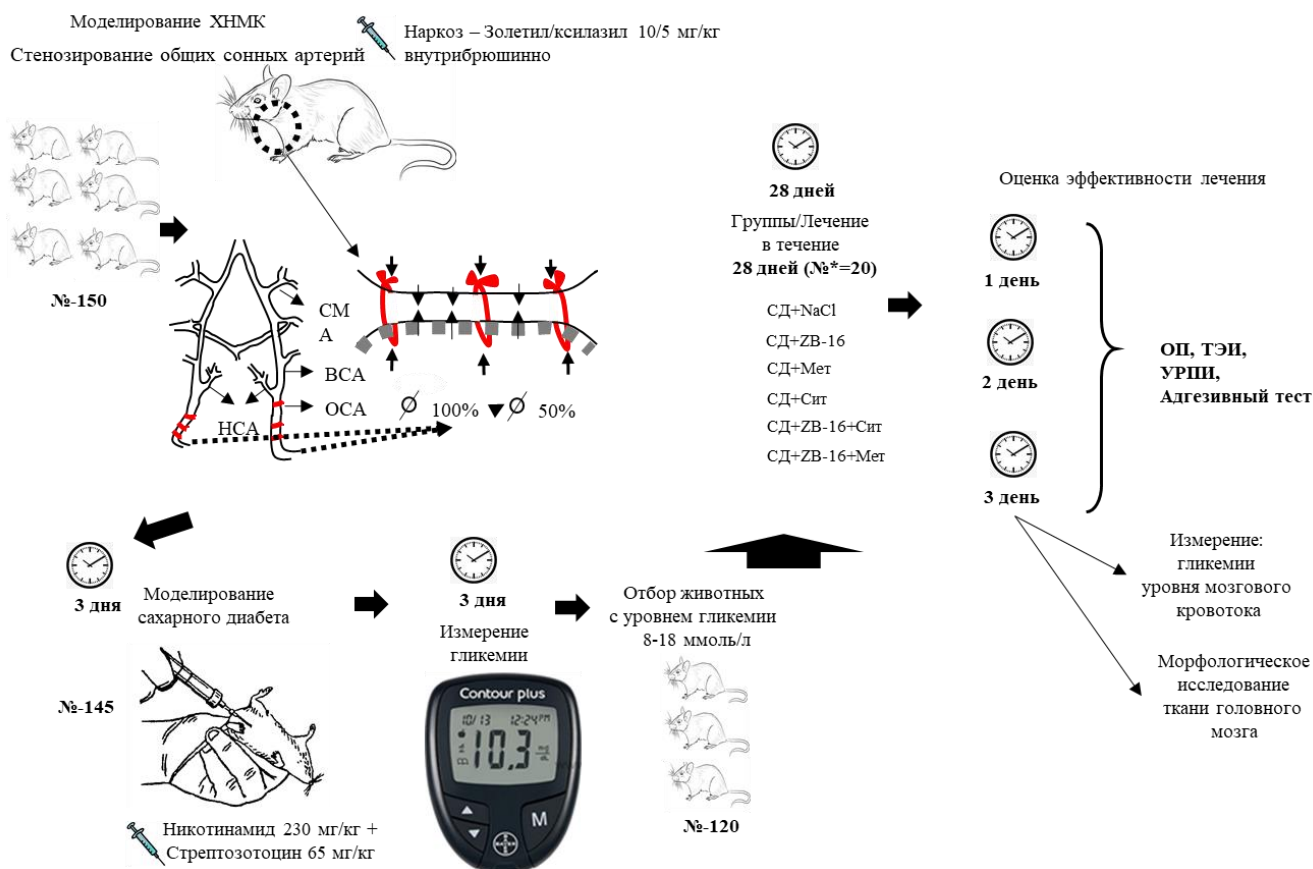


Рисунок 55. Дизайн исследования плеiotропного действия нового агониста GRP119 соединения ZB-16 на модели ХНМК, воспроизведенной на фоне ЭСД

В настоящем исследовании у экспериментальных животных было воспроизведено ХНМК путем стенозирования общих сонных артерий. Через 5 дней после операции этим животным был воспроизведен экспериментальный СД, и после измерения (на третий день) уровня гликемии животные были распределены на группы и стали получать «лечение».

На 28-й день «терапии» СД и ХНМК животные тестировались в ОП (рис.56). В тесте «Открытое поле» двигательная и ориентировочно-исследовательская активности животных с экспериментальным стенозом общих сонных артерий были на 40% и 52% ниже, чем в интактной группе. У животных, которым был смоделирован СД, регистрируемые в «ОП» показатели были ниже на 35% и 39%, чем у интактных животных. Ограничение мозгового кровотока и хроническая гипергликемия прогнозируемо оказывает большее повреждающее действие, чем эти

патологические факторы по отдельности. Так, у животных с комбинированной патологией показатели, отражающие число совершаемых ими двигательных и исследовательских актов, были ниже на 60% и 72%, чем у интактных, на 34% и 42% ниже, чем у стенозированных, и на 39% и 55% ниже, чем в группе с экспериментальным СД.

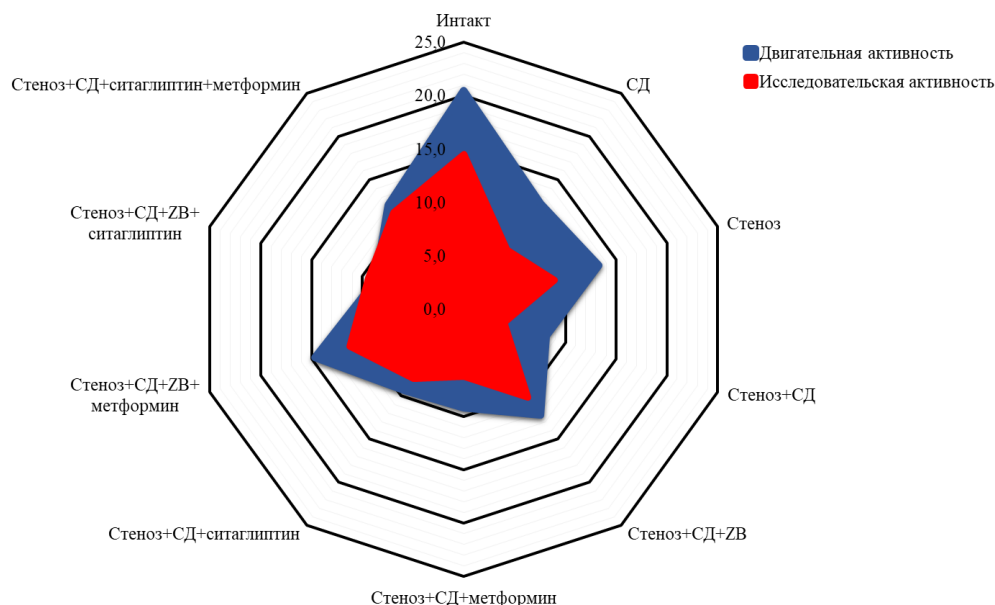


Рисунок 56. Результаты тестирования животных с ЭСД и ХНМК в «Открытом поле»

Курсовое пероральное введение соединения ZB-16 компенсирует нарушения углеводного обмена, значительно улучшая утилизацию глюкозы при проведении ПТТГ животным с экспериментальным СД. При оценке их поведения в «ОП» было обнаружено, что двигательная и ориентировочно-исследовательская активности на 51% и 156% были выше, чем в группе с аналогичной патологией, но не получавшей «лечение». У животных, которым перорально вводили соединение ZB-16 в комбинации с метформином, эти показатели превышали контрольные на 81% и 181%, а в комбинации с ситаглиптином на 8% и 136% соответственно. У животных, которым перорально вводили только метформин или только ситаглиптин, показатели отличались от контрольных на 81% и 181%, или 16% и 100% соответственно, а у тех, которые получали комбинацию этих препаратов, на 49% и 181%. Таким образом, соединение ZB-16 сопоставимо с метформином,

компенсирует нарушения углеводного обмена и оказывает более выраженное нейропротективное действие.

ХНМК и гипергликемия приводили к различным нарушениям памяти у экспериментальных животных. Так, стенозирование общих сонных артерий привело к тому, что 45% экспериментальных животных забыли об электроболевым раздражении, полученном в установке УРПИ, и зашли в него при повторном тестировании, ЛП захода был ниже, чем при воспроизведении на следующий день после обучения, что свидетельствует о нарушении процесса формирования памяти. Время решения экстраполяционной задачи этими животными по сравнению с аналогичным показателем в интактной группе было больше на 206% и на 19%, чем зафиксированное при воспроизведении на следующий день после обучения. Длительная гипергликемия в меньшей степени, чем стеноз, но приводила к нарушению памяти экспериментальных животных. Так, 40% крыс с 28-дневной гипергликемией и не получавших «лечение», зашли в темный отсек установки УРПИ, причем сделали это на 21% быстрее, чем при тестировании на следующий день после обучения. Также животные этой группы на 17% и 109% медленнее решали экстраполяционную задачу, чем в первый раз после обучения и чем животные интактной группы соответственно (рис.57).

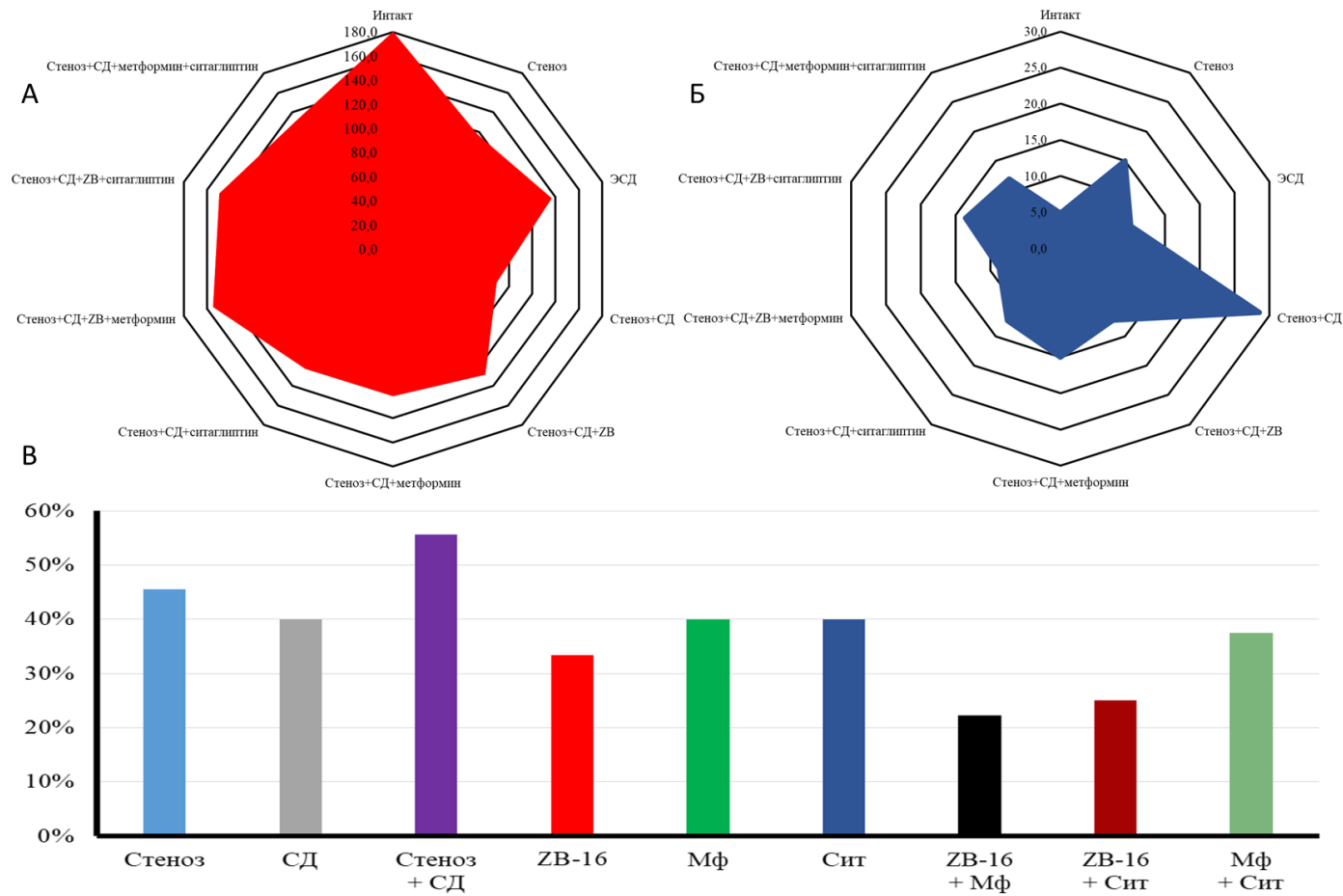


Рисунок 57. Результаты тестирования животных с ХНМК и ЭСД в тестах УРПИ (А), ТЭИ (Б) и число животных, зашедших с темный отсек установки УРПИ (В)

ХНМК у животных с экспериментальным СД более значимо, чем эти патологии по отдельности оказывало повреждающее действие в отношении ЦНС животных. Так, 56% животных зашли в темный отсек УРПИ, при этом они сделали это на 28%, 50%, 35% и 24% быстрее, чем при первом воспроизведении, а также животные интактной, группы с экспериментальным СД или стенозом. Также эти животные медленнее на 42%, 483%, 183% и 90%, чем при первом воспроизведении, и животные интактной, группы с экспериментальным СД или стенозом, решали экстраполяционную задачу в ТЭИ. Курсовое пероральное введение экспериментальным животным с ХНМК и СД метформина и ситаглиптина не оказывало значимое влияние на показатели их когнитивной функции. Так, по 40% животных, которым вводили метформин и ситаглиптин, забывали о получении болевого раздражения в темном отсеке УРПИ, заходя в него на 16% и 17%, чем при первом воспроизведении, но на 36% и 37% дольше группы, не получавшей «лечения». Животные этих групп на 6% и 28% быстрее, чем в первый раз, и на 47% и 57% быстрее контрольной решали экстраполяционную задачу. Комбинированное введение этих препаратов также не оказывало значительного церебропротективного эффекта, поскольку 38% животных зашли в темный отсек УРПИ, сделали это на 7% быстрее, чем при первом воспроизведении, но на 49% медленнее контрольной группы, они также на 25% и 58% быстрее первого раза и животных контрольной группы решили экстраполяционную задачу в ТЭИ.

Пероральное введение соединения ZB-16, но более выражено его комбинация с метформином или ситаглиптином, оказывало церебропротективное действие. У животных, которым вводили только ZB-16, латентный период захода в темный отсек был только на 11% меньше, чем при первом воспроизведении, и на 44% больше группы, не получавшей «лечение», при этом только 33% животных группы забыли об электро-болевым раздражении. Животные этой группы на 17% и 57% быстрее решали

экстраполяционную задачу, чем в первый раз, и контрольная группа соответственно. Пероральное введение соединения ZB-16 в комбинации с метформином или ситаглиптином привело к тому, что только 22% и 25% животных этих групп зашли в темный отсек установки УРПИ, при этом сделали это всего на 9% и 6% быстрее, чем при первом воспроизведении навыка, но на 74% и 68% медленнее животных контрольной группы. Также животные этих групп значительно быстрее на 35% и 21%, чем при первом воспроизведении, решали экстраполяционную задачу, и на 69% и 52% быстрее контрольных.

При СД и ХНМК отмечаются нарушения сенсомоторной функции. При тестировании животных с помощью адгезивного теста было отмечено увеличение времени обнаружения и удаления инородного предмета, закрепленного на волярной поверхности передних лап по сравнению с животными интактной группы, у которых эти показатели практически не изменились (рис.58) и спустя 14 дней. У животных, которым моделировали СД, стеноз общих сонных артерий или комбинацию этих патологий, отмечались сенсомоторные нарушения, которые прогрессировали со временем. Так, они дольше не обращали внимания и не удаляли инородный предмет, закрепленный на лапе, при этом различия были достоверными не только с группой интактных животных, но и по сравнению с результатами проведения аналогичного теста двумя неделями ранее. Животные, которым был смоделирован только экспериментальный СД, обнаруживали инородный предмет на лапках в среднем за $62,8 \pm 15,3$ с; $65,1 \pm 15,2$ с и удаляли его за $100,3 \pm 23,3$ с; $101,3 \pm 19,1$ с (для левой и правой лап соответственно), что было на 94% и 60%; 78% и 59% дольше, чем у интактных, и на 21% и 25%; 7% и 12% дольше по сравнению с результатами, полученными от этих животных на 14 день. У животных, которым был смоделирован стеноз, на 28 день при проведении адгезивного теста было отмечено, что они обнаруживали и устраняли пластырь в среднем на $65 \pm 10,9$ с и $72,3 \pm 8,2$ с; $106,1 \pm 19,7$ с и $109,7 \pm 16,6$ с (для левой и правой лапы соответственно), т.е.

на 101% и 77%; 88% и 72% дольше интактных животных, и на 50% и 43%; 11% и 21% дольше, чем при их тестировании на 14 день после стенозирования ОСА. Необходимо отметить, что экспериментальный СД и стеноз вызывали выраженный сенсомоторный дефицит, так, в группе животных с СД 33% крыс не сняли лейкопластырь с одной лапки, а 25% с двух, в то же время 40% и 30% животных, которым был смоделирован стеноз, не сняли пластырь с одной или обеих лап.

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

У животных с экспериментальным СД и ХНМК, курсом получавших метформин и ситаглиптин, сенсомоторные нарушения были выражены меньше, чем у животных контрольной группы. По сравнению с результатами, полученными на 14 день лечения, крысы этих групп на 31% и 44%; 23% и 23% быстрее обнаруживали (для левой и правой лапы соответственно) и на 11% и 15%; 16% и 10% быстрее удаляли инородный предмет с левой и правой лапы соответственно. Половина животных, которые получали метформин, не удали пластырь с одной и 30% с обеих лап, а 40% животных, получавших ситаглиптин, не удалили его с обеих лап (рис.58).

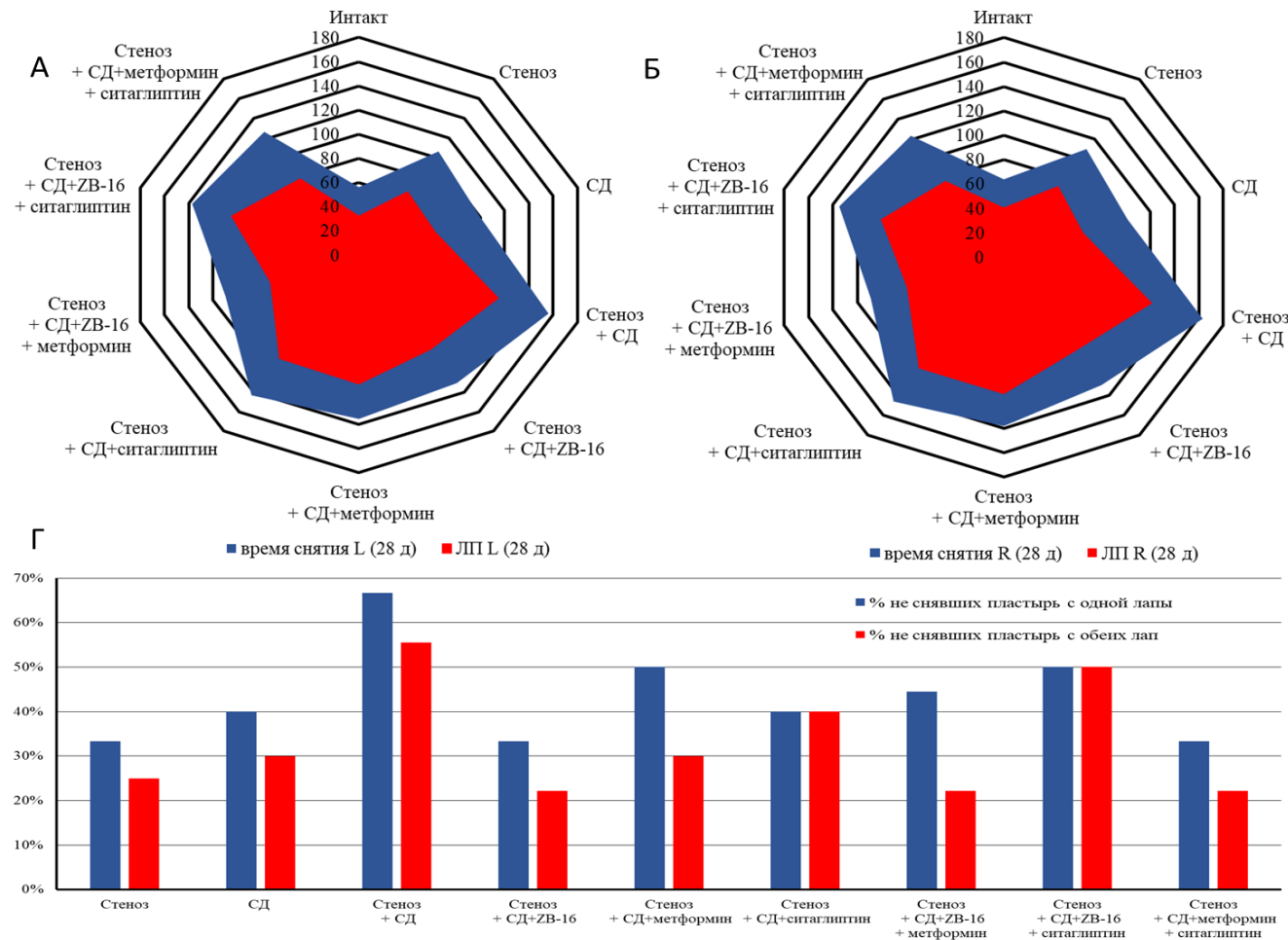


Рисунок 58. Результаты проведения адгезивного теста у животных с ХНМК и ЭСД. Снятие инородного предмета с левой (А), правой (Б) лапы и число животных, не снявших пластырь с одной или двух лап (В)

Комбинация метформина с ситаглиптином, вводимая перорально в течение 28-днев «лечения», более существенно, чем каждый препарат, вводимый отдельно, ограничивала развитие сенсомоторного дефицита у животных с экспериментальным СД и ХНМК. Так, животные этой группы на 32% и 36%; 19% и 25% быстрее обнаруживали и снимали пластырь, закрепленный на волярной поверхности передних лап. При этом они делали это только на 20% и 6%; 13% и 6% дольше по сравнению с результатами тестирования, проведенного через 14 дней после начала лечения. Менее половины (33%) животных не сняли пластырь за 3 минуты с одной лапы и менее четверти (22%) с двух.

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

Комбинированное введение ZB-16 с метформином, но не с ситаглиптином, оказывает более выраженное гипогликемическое и церебропротективное действие, чем применение препаратов поотдельности или комбинации метформина с ситаглиптином. Так, животные с экспериментальным СД и ХНМК, которым в течение 28-днев перорально вводили ZB-16 в комбинации с метформином, на 37% и 35%; 30% и 33% быстрее контрольных обнаруживали и удаляли лейкопластырь с лапок, но на 17% и 29%; 2% и 13% делали это медленнее, чем через 14 дней после начала

лечения, что было быстрее, чем в остальных группах с комбинированной патологией вне зависимости от проводимой терапии. Таким образом, соединение ZB-16, и более выраженно его комбинация с метформином, оказывает не только гипогликемическое действие, но и ограничивает развитие сенсомоторных нарушений вследствие экспериментального СД и ХНМК, отмеченных у животных, не получавших «лечение». При этом необходимо отметить, что оказываемое влияние соединения ZB-16 в отношении ограничения развития сенсомоторного дефицита было более выражено, чем у метформина, а гипогликемическое менее, что указывает на наличие дополнительного и иного, чем снижение гипергликемии, механизма церебропротективного действия ZB-16.

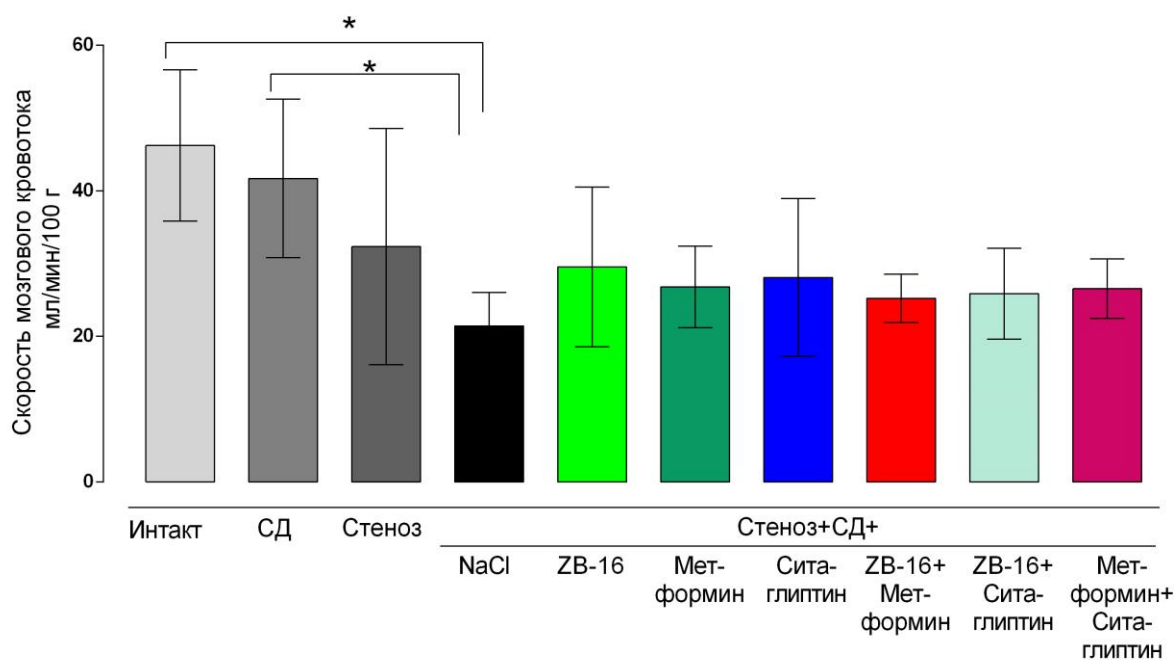


Рисунок 59. Скорость мозгового кровотока животных СД и ХНМК через 28 дней лечения соединением ZB-16, метформином, ситаглиптином и их комбинациями. Обозначения: различия достоверны при $p \leq 0,05$, критерий Дана

На завершающем этапе данного исследования у всех экспериментальных животных оценивался уровень мозгового кровотока. Этот показатель достоверно различался у интактных животных, тех, которым только стенозировали ОСА или моделировали экспериментальный СД, а

также воспроизводили комбинацию этих патологий. Курсовое пероральное введение соединения ZB-16, метформина, ситаглиптина или их комбинаций значимо не повышало уровень мозгового кровотока животных с экспериментальным СД и ХНМК, но в группах, получавших «лечение», он был выше, чем у тех, кому вводили физиологический раствор, приближаясь к значениям, зафиксированным у животных с ХНМК, но без диабета (рис.59).

7.3. Морфологическое исследование ткани головного мозга животных с экспериментальным СД и ХНМК, которым курсом перорально вводили соединение ZB-16, метформин, ситаглиптин и их комбинации^{***}

При морфологическом исследовании ткани головного мозга было обнаружено, что у животных, которым был смоделирован СД, наблюдались слабые структурные изменения, которые, в целом, укладывались в рамки физиологической вариабельности нервных клеток и особенностей строения нейронов различных отделов головного мозга. Так, в моторных и соматосенсорных отделах церебральной коры структурные изменения сводились к сморщиванию и гиперхромии цитоплазмы отдельных нейронов ганглионарного слоя. Гиперхромные изменения наблюдались у 70% экспериментальных животных. Таким образом, несмотря на кажущуюся незначительность морфологических изменений и снижение уровня мозгового кровотока, у животных отмечались выраженные когнитивные и сенсомоторные нарушения.

^{***} Исследование выполнено совместно с кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО ВолгГМУ за что выражаем искреннюю благодарность зав. кафедрой, д.м.н. А.В. Смирнову и всем сотрудникам

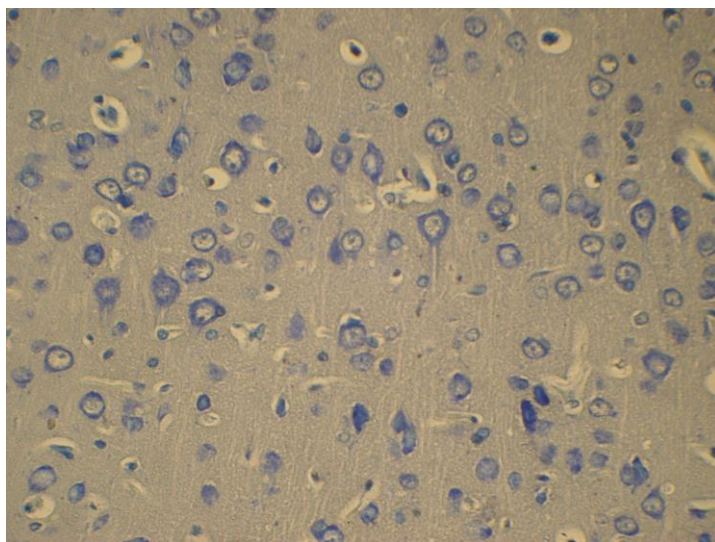


Рисунок 60. Единичные гиперхромные клетки коры больших полушарий. Моторная область коры головного мозга крысы (экспериментальный сахарный диабет). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение x 400

Нейроны пирамидного слоя СА1 поля располагались компактно, имели округлую форму ядра с четко визуализируемым ядрышком, равномерным распределением хроматина (Рисунок 60). Перикарионы нейронов имели близкую к округлой форму, с равномерным распределением субстанции Ниссля в цитоплазме. Как и у интактных животных, у крыс с месячным экспериментальным СД визуализировались единичные гиперхромные нейроны. В СА3 поле нейроны пирамидного слоя располагались менее компактно, часть клеток имело округлую, а часть полигональную форму с четко визуализируемым ядром. Большинство нейронов характеризовалось неравномерной базофилией цитоплазмы, с более интенсивной окраской по периферии перикарионов. Также, как и в СА1 поле, обнаруживались гиперхромные клетки, характеризующиеся незначительным уменьшением размеров перикариона, усилением базофилии цитоплазмы, наличием темных и пикноморфных ядер. Выраженная гиперхромия нейронов обнаруживалась редко. Со стороны нейронов других зон гиппокампа, зубчатой извилины значимых патоморфологических изменений выявлено не было.

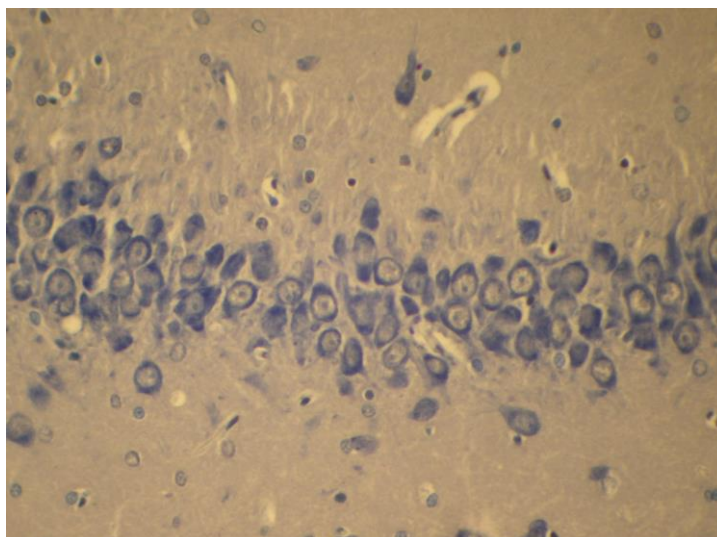


Рисунок 61. Умеренно выраженная гиперхромия нейронов пирамидного слоя вентрального гиппокампа (CA3). Головной мозг крысы (экспериментальный СД). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение x 400

У животных, которым кровоток по сонным артериям ограничивали до 50% от начального, микроскопическое исследование выявило различие в выраженности морфологических изменений в структурных образованиях лимбической системы и коры головного мозга. В структурах гиппокампа наблюдались распространенные патоморфологические изменения, носящие умеренный характер, в то время как в церебральной коре они были более выражены (Рисунок 61).

В моторной и соматосенсорной областях коры выявлялись участки некротических изменений, захватывающих все слои. Данные участки характеризовались тотальной гиперхромией и гомогенизацией цитоплазмы нейронов и глиальных клеток. Ядра в большинстве клеток не визуализировались. Отмечалось увеличение численной плотности клеток микроглии. Имели место выраженные признаки периваскулярного и перицеллюлярного отека. В случае отсутствия некрозов преобладали признаки гиперхромии и сморщивания клеточных тел, зачастую распространяющиеся на все слои коры. У части животных обнаруживались очаги клеточного выпадения, затрагивающие преимущественно

ганглионарный слой, и в меньшей степени нейроны II, III, IV слоев коры больших полушарий.

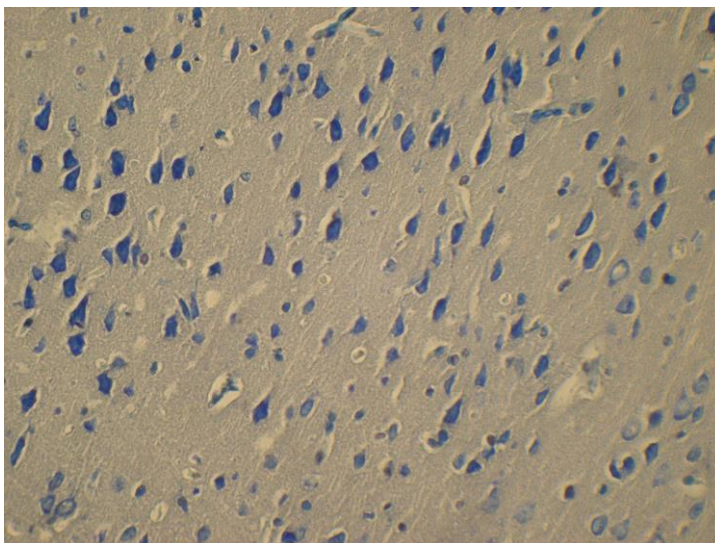


Рисунок 62. Выраженное сморщивание нейронов коры больших полушарий. Моторная область коры головного мозга крысы (двусторонний стеноз ОСА). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение x 400

У животных со стенозом ОСА наблюдались умеренные изменения клеток пирамидного слоя СА1 поля вентрального и дорсального гиппокампа в виде появления отдельных нейронов с пикнозом и гиперхромией ядер и гомогенизацией цитоплазмы. В СА3 поле изменения носили более распространенный характер и выражались в деформации клеточных тел и ядер, усилении базофилии цитоплазмы нейронов. Существенных изменений ядерного аппарата нейронов пирамидного слоя не наблюдалось. Морфологические изменения нервных клеток зубчатой извилины животных с ХНМК принципиально не отличались от изменений, наблюдаемых у интактных животных. Выраженные морфологические изменения в структурах, отвечающих за выполнение сенсомоторной функции, очевидно, были причиной негативных результатов, полученных при проведении адгезивного теста (Рисунок 62).

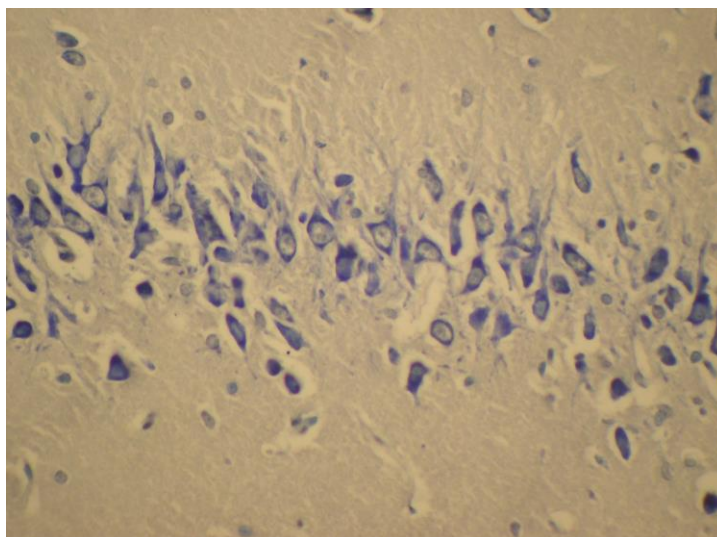


Рисунок 63. Значительное количество деформированных пикнотических нейронов пирамидного слоя СА3. Головной мозг крысы (двусторонний стеноз ОСА). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение x 400

При гистологическом исследовании структур головного мозга животных, которым был смоделирован стеноз ОСА и ЭСД, выявлены выраженные патоморфологические изменения. Прежде всего, обращает на себя внимание наличие выраженных кортикальных некрозов у 30% экспериментальных животных. Как правило некротические изменения захватывали все слои церебральной коры и затрагивали преимущественно моторный и соматосенсорный отделы. Вокруг очагов некроза и клеточного опустошения отмечалась микроглиальная реакция. У 70% животных в данных отделах церебральной коры регистрировались стереотипные морфологические изменения. Большинство нейронов ганглионарного слоя характеризовалось сморщиванием клеточных тел, умеренным усилением базофилии цитоплазмы, наличием пикнотических, деформированных ядер с сохранным ядрышком. Встречались единичные клетки с резко гиперхромной цитоплазмой, в которой не определялось базофильное вещество. У отдельных животных наблюдались распространенные изменения нейронов и глиальных клеток 1-го слоя энторинальной коры в виде сморщивания, деформации и гиперхромии клеточных тел (Рисунок 63).

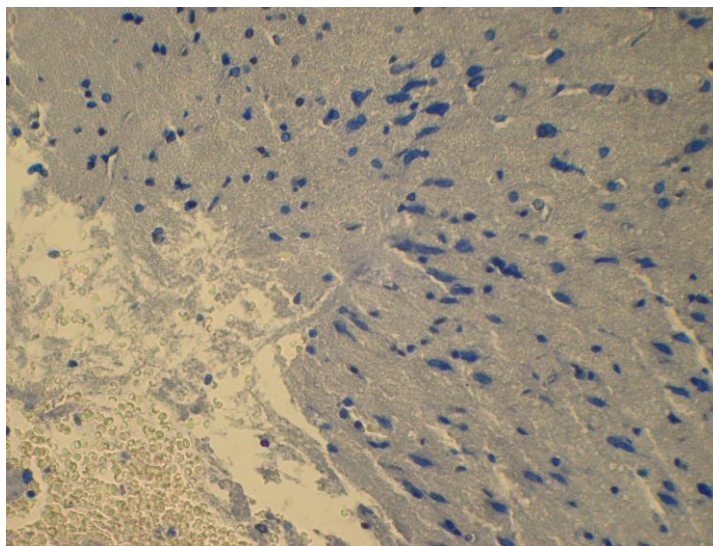


Рисунок 64. Очаги некроза и мелких кровоизлияний, а также выраженное сморщивание нейронов коры больших полушарий. Моторная область коры головного мозга крысы (комбинация двустороннего стеноза ОСА с экспериментальным СД). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение x 400

При изучении структур лимбической системы выявлены умеренные патоморфологические изменения. Значимые изменения в виде сморщивания и деформации некоторых нейронов фиксировались только в пирамидном слое СА3 зоны гиппокампа. Зачастую клетки приобретали вытянутую и извитую форму. Деформированные, пикноморфные ядра хорошо визуализировались на фоне гиперхромной цитоплазмы. У половины экспериментальных животных выявлялись участки пирамидного слоя, характеризующиеся резким сморщиванием и деформацией клеточных тел, гомогенизацией цитоплазмы пикнозом и гиперхромией ядер. В единичных случаях изменения носили некробиотический характер с резким просветлением и гомогенизацией цитоплазмы признаками кариолизиса и, в конечной стадии, распадом клетки на фрагменты. В других зонах гиппокампа встречались лишь единичные сморщенные, гиперхромные клетки. Изменения нейронов зубчатой извилины носили минимальный характер и принципиально не отличались от интактных животных (Рисунок 64).

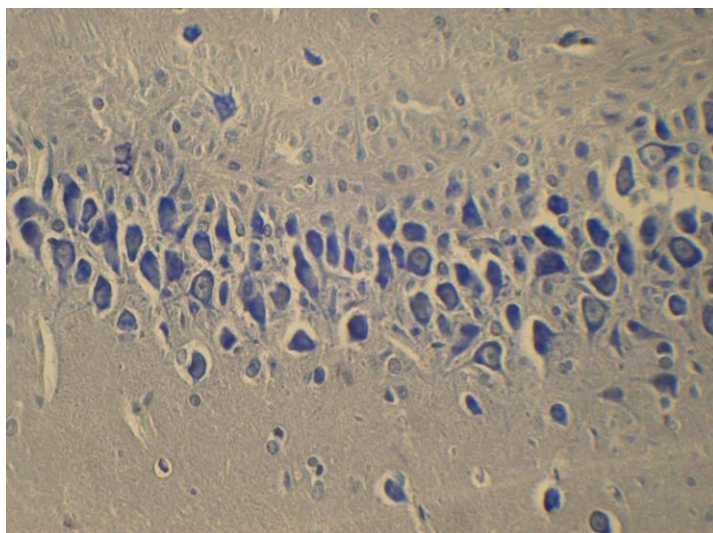


Рисунок 65. Значительное количество деформированных пикнотических гиперхромных нейронов пирамидного слоя СА3. Головной мозг крысы (комбинация двустороннего стеноза ОСА с экспериментальным СД). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение x 400

Выраженные патоморфологические изменения у животных с ЭСД и ХНМК, которым в течение 28-дней перорально вводили ситаглиптин, фиксировались в моторной области коры, что коррелирует с результатами, полученными при проведении адгезивного теста. У отдельных животных наблюдались явления выраженных кортикальных некрозов с тяжелыми дегенеративными изменениями в виде сморщивания нервных клеток резко выраженной гиперхромии ядра и цитоплазмы. В то же время часть нейронов характеризовалась просветлением и гомогенизацией цитоплазмы перикарионов. У большей части крыс данной экспериментальной группы, в моторных областях коры, выявлялись обширные области нейродегенеративных изменений, захватывающих преимущественно верхние слои (II, III), а иногда распространяющиеся на III, IV, V коры больших полушарий. В других функциональных отделах коры фиксировались умеренные изменения в виде мелких очагов гиперхромных клеток, локализующиеся в наружном и внутреннем зернистом, пирамидном, а также ганглионарном слоях церебральной коры (Рисунок 65).

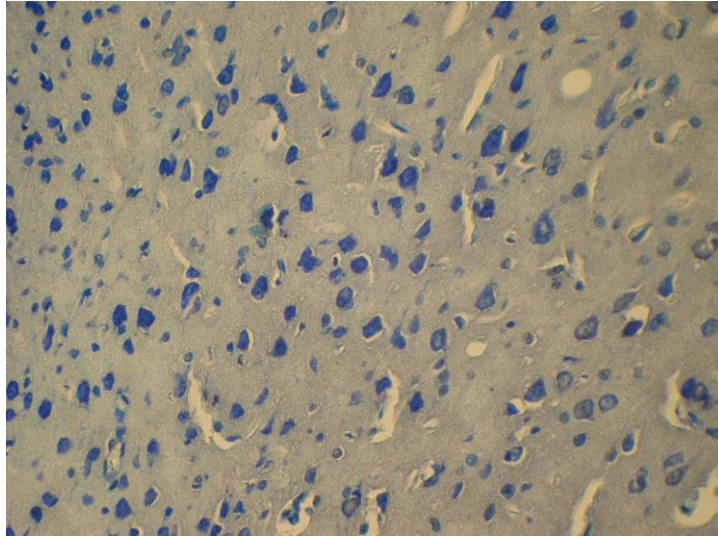


Рисунок 66. Выраженный гиперхроматоз нейронов коры больших полушарий. Моторная область коры головного мозга крысы (комбинация двустороннего стеноза ОСА с экспериментальным СД на фоне лечения ситаглиптином). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение x 400

В СА1 поле гиппокампа патоморфологические изменения носили слабовыраженный характер. В пирамидном слое встречались единичные «темные» нейроны, что было характерно и для животных без экспериментального воздействия (интакт). В то же время в СА3 изменения носили более значимый характер. Фиксировались протяженные участки пирамидного слоя со значительными дистрофическими изменениями. Нервные клетки теряли сферичность, деформировалось и удлинялось ядро. усиливалась базофилия цитоплазмы. В отдельных нейронах выраженные гиперхромные изменения цитоплазмы и ядер затрудняли визуализацию ядра. Кроме того, обнаруживались нейроны с резкой деформацией клеточных тел, тигролизом, гомогенизацией цитоплазмы и признаками кариолизиса (Рисунок 66).

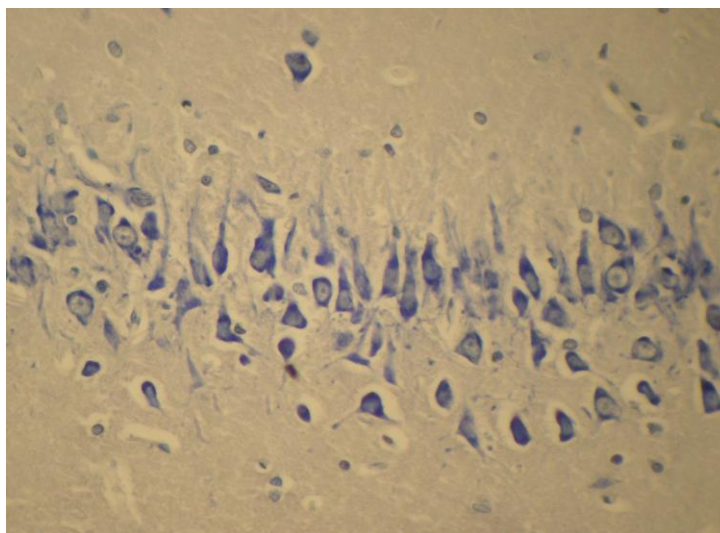


Рисунок 67. Значительное количество деформированных пикнотических нейронов пирамидного слоя СА3. Головной мозг крысы (комбинация двустороннего стеноза ОСА с экспериментальным СД на фоне лечения ситаглиптином). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение x 400

При микроскопическом изучении серийных срезов головного мозга животных с ХНМК и СД, которым в течении 28-дней перорально вводили метформин, обращал на себя внимание тот факт, что патоморфологические изменения в структурах лимбической системы носили более выраженный характер по сравнению с различными отделами коры головного мозга. В различных функциональных отделах церебральной коры изменения ограничивались появлением очагов, характеризующихся гиперхромными изменениями нейронов и клеток глии. Данные очаги, преимущественно локализовались в ганглионарном слое коры (Рисунок 67).

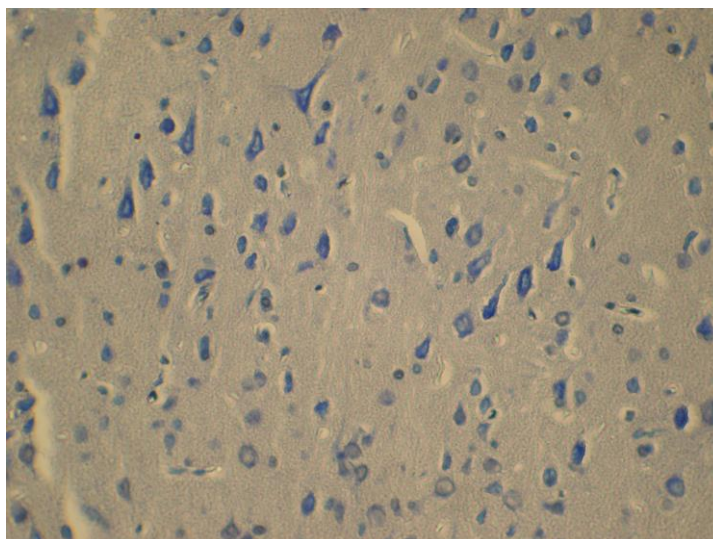


Рисунок 68. Увеличение сморщенных, гиперхромных нейронов коры больших полушарий. Моторная область коры головного мозга крысы (комбинация двустороннего стеноза ОСА с экспериментальным СД на фоне лечения метформином). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение x 400

При исследовании различных отделов гиппокампа максимальные изменения обнаруживались в СА3 зоне. Здесь обнаруживалось большое количество пирамидальных клеток, характеризующихся уменьшением и деформацией клеточных тел, пикнозом ядер, усилением базофилии цитоплазмы. Зачастую клетки приобретали вытянутую или полигональную форму. В выраженной стадии клетки представляли собой темные гомогенные образования с плохо выделяющимся ядром и четко очерченным контуром. Данные изменения носили распространенный характер и захватывали как дорсальные, так и вентральные отделы гиппокампа. Схожий, но менее выраженный характер патоморфологических изменений наблюдался в СА1 зоне, где фиксировались единичные гиперхромные клетки. В зубчатой извилине значимых изменений обнаружено не было (Рисунок 68).

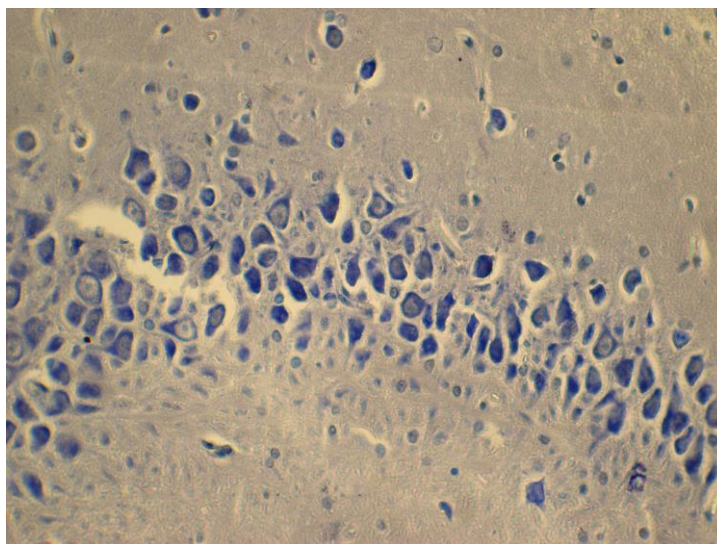


Рисунок 69. Значительное количество деформированных пикнотических нейронов пирамидного слоя СА3. Головной мозг крысы (комбинация двустороннего стеноза ОСА с экспериментальным СД на фоне лечения метформином). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение x 400

В данной экспериментальной группе, животным которой были смоделированы ХНМК и ЭСД, а также перорально вводили соединение ZB-16, фиксировались слабовыраженные патоморфологические изменения структур головного мозга. В церебральной коре значимые изменения визуализировались преимущественно в моторных отделах и проявлялись наличием участков наружного зернистого и пирамидного слоев, характеризующихся умеренным сморщиванием нейронов. Характерными признаками данного вида повреждения являлись уменьшение размеров клеток и гиперхроматоз. Глыбки тигроида сливались в компактную, темно окрашенную массу. В итоге, нервные клетки имели вид интенсивно окрашенных узких, угловатых образований. В других функциональных отделах коры структурные изменения существенно не отличались от интактных животных. В наружном и внутреннем зернистом, а также пирамидном слоях коры наблюдались клетки с признаками умеренных гиперхромных изменений (Рисунок 69).

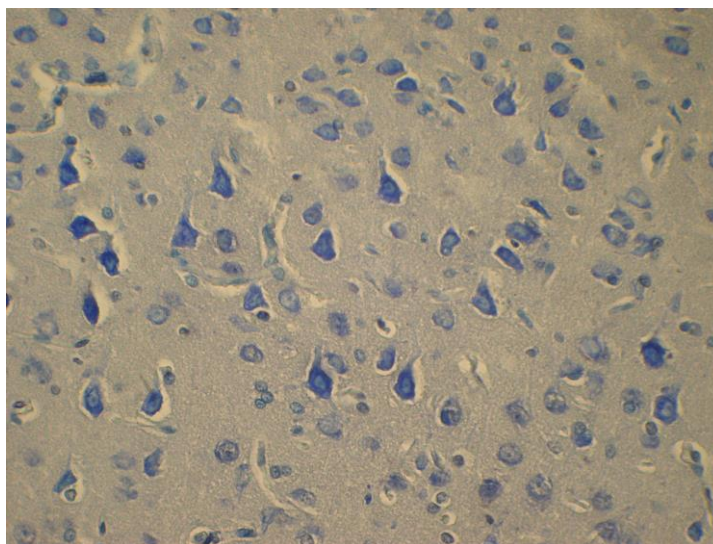


Рисунок 70. Очаговый гиперхроматоз нейронов коры больших полушарий. Моторная область коры головного мозга крысы (комбинация двустороннего стеноза ОСА с экспериментальным СД на фоне лечения ZB-16). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение х 400

В структурах лимбической системы морфологические изменения носили следующий характер. В СА1 дорсальных отделов гиппокампа пирамидные клетки характеризовались отсутствием значимых патогистологических изменений. В вентральных отделах обнаруживались участки пирамидного слоя с умеренным увеличением размеров нейронов, очаговой гиперхромией цитоплазмы, но без существенных изменений их ядерного аппарата. В СА3 увеличивалось количество пирамидальных нейронов со слабыми гиперхромными изменениями. Данные клетки отличались очаговым усилением базофилии цитоплазмы, полигональной или треугольной формой перикариона. Как правило, изменения носили очаговый характер и фиксировались как в вентральных, так и дорсальных отделах гиппокампа (Рисунок 70, Рисунок 71).

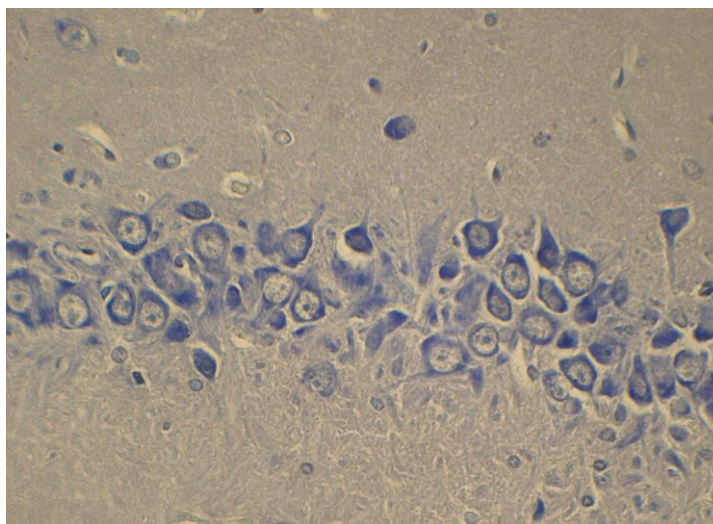


Рисунок 71. Наличие полигональных нейронов с очаговой базофилией цитоплазмы в пирамидном слое гиппокампа СА3. Головной мозг крысы (комбинация двустороннего стеноза ОСА с экспериментальным СД на фоне лечения ZB-16). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение x 400

В моторных областях церебральной коры животных, с ХНМК и ЭСД, которым перорально вводили соединение ZB-16 и ситаглиптин, наблюдались очаговые изменения в виде гиперхромии цитоплазмы нейронов и клеток глии. Такие «темные» нейроны имели вытянутую или полигональную форму с хорошо видимыми ядрами и ядрышками. Необходимо отметить, что данные очаговые изменения фиксировались преимущественно в наружном и внутреннем зернистом и пирамидных слоях церебральной коры. Во II, III, IV слоях соматосенсорной области коры выявлялись только единичные нейроны, характеризующиеся усилением базофилии матрикса цитоплазмы и кариоплазмы, уменьшением размеров клеточных тел. Морфологические изменения в гиппокампе носили незначительный характер. Структура пирамидальных клеток СА1 и СА3 вентрального и дорсального гиппокампа существенно не отличалась от интактных животных. Однако встречались единичные клетки, характеризующиеся уменьшением размеров клеточных тел, полигональной и или извитой формой перикарионов и усилением базофилии цитоплазмы. В остальных зонах гиппокампа и зубчатой извилины патогистологические изменения не выявлялись (Рисунок 72, Рисунок 73).

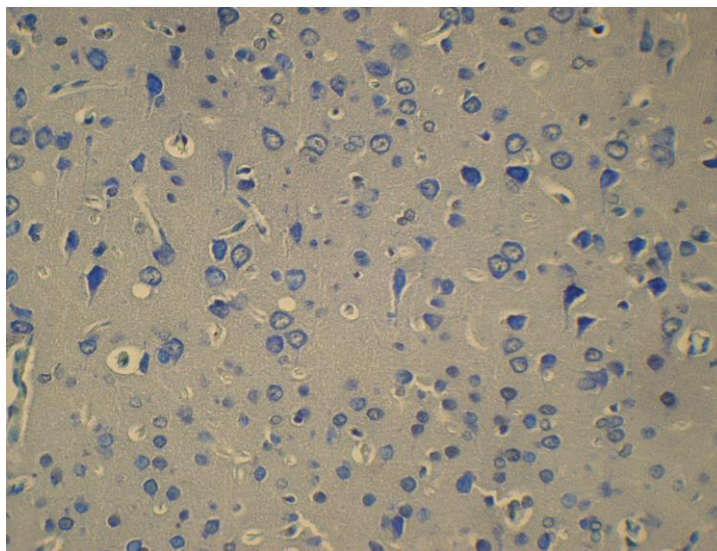


Рисунок 72. Гиперхроматоз отдельных нейронов коры больших полушарий. Моторная область коры головного мозга крысы (комбинация двустороннего стеноза ОСА с экспериментальным СД на фоне лечения ZB-16+ситаглиптин). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение x 400

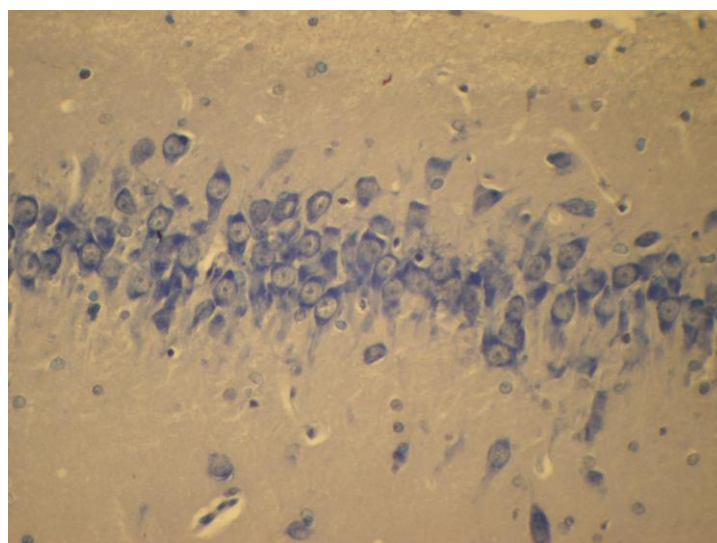


Рисунок 73. Умеренно выраженная гиперхромия нейронов пирамидного слоя вентрального гиппокампа (CA3). Головной мозг крысы (комбинация двустороннего стеноза ОСА с экспериментальным СД на фоне лечения ZB-16+ситаглиптин). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение x 400

Патоморфологические изменения в ткани головного мозга животных с ХНМК и ЭСД, которым перорально вводили соединение ZB-16 и метформин, носили слабовыраженный характер и существенно не отличались от

изменений, наблюдаемых у животных без экспериментального воздействия. На препаратах коры больших полушарий крыс (моторная и соматосенсорная области), окрашенных по методу Ниссля, во всех слоях преобладали нормохромные клетки симметричной формы с равномерно распределенной хроматофильной субстанцией в цитоплазме. Ядра имели округлую форму, с крупными ядрышками, располагающимися обычно в центре ядра. Патологические изменения выражались, преимущественно, в сморщивании и гиперхромии некоторых клеток ганглионарного слоя коры головного мозга. У отдельных животных в моторной области коры гиперхромные клетки выявлялись не только в ганглионарном, но и пирамидном слое (Рисунок 73, Рисунок 74).

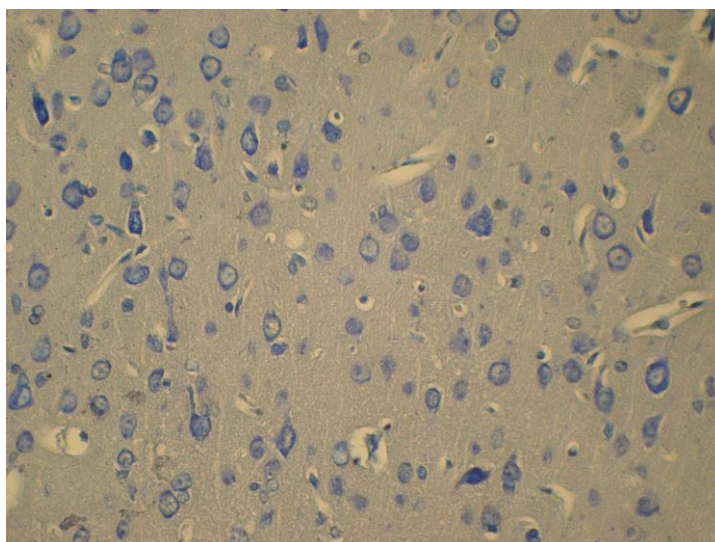


Рисунок 74. Сморщивание единичных нейронов коры больших полушарий. Моторная область коры головного мозга крысы (комбинация двустороннего стеноза ОСА с экспериментальным СД на фоне лечения ZB-16+метформин). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение x 400

Особенностью данной экспериментальной группы животных является увеличение, по сравнению с интактными, количества нейронов, характеризующихся умеренными патоморфологическими изменениями, как в СА1, так и, в большей степени, СА3 полях гиппокампа. Данные изменения проявлялись в изменении формы пирамидальных клеток, которые

приобретали полигональные очертания. Характерно незначительное увеличение объема перикарионов с очаговым усилением базофилии цитоплазмы. Встречались и единичные нейроны с выраженной гиперхромией ядра и цитоплазмы, что, однако, наблюдалось и у некоторых интактных животных (Рисунок 75).

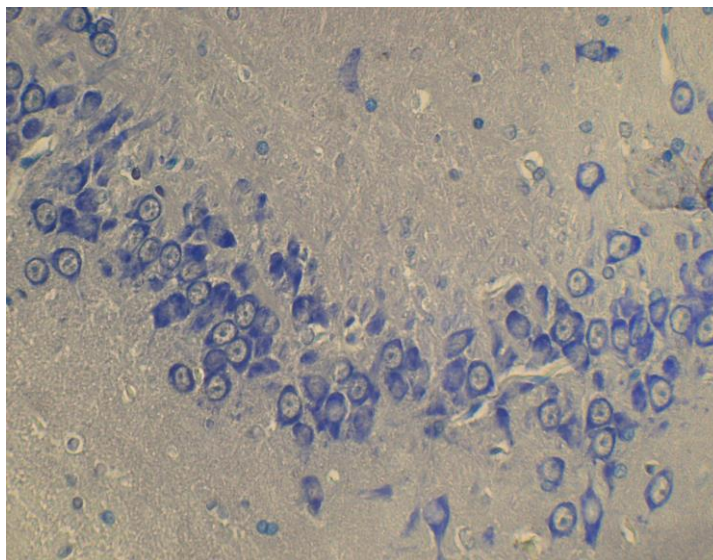


Рисунок 75. Умеренно выраженная гиперхромия нейронов пирамидного слоя вентрального гиппокампа (CA3). Головной мозг крысы (комбинация двустороннего стеноза ОСА с экспериментальным СД на фоне лечения ZB-16+метформин). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение x 400

В структурах лимбической системы животных с ХНМК и ЭСД, а которым 28 дней вводили комбинацию ситаглиптина и метформина, наблюдались умеренные патоморфологические изменения. В CA1 зоне вентрального и дорсального гиппокампа фиксировались единичные нейроны пирамидного слоя, характеризующиеся выраженной гиперхромией ядра и цитоплазмы, уменьшением размеров клеточных тел. В CA3 зоне большинство нейронов характеризовалось умеренными дегенеративными изменениями. Пирамидальные нейроны имели неправильную, полигональную форму с усилением очаговой гиперхромии перикариона. Ядра, как правило, имели округлую форму с хорошо видимым ядрышком, хотя встречались клетки с пикноморфными, деформированными ядрами. Как

и в СА1 зоне встречались единичные клетки пирамидного слоя с выраженной гиперхромией ядра и цитоплазмы (Рисунок 76).

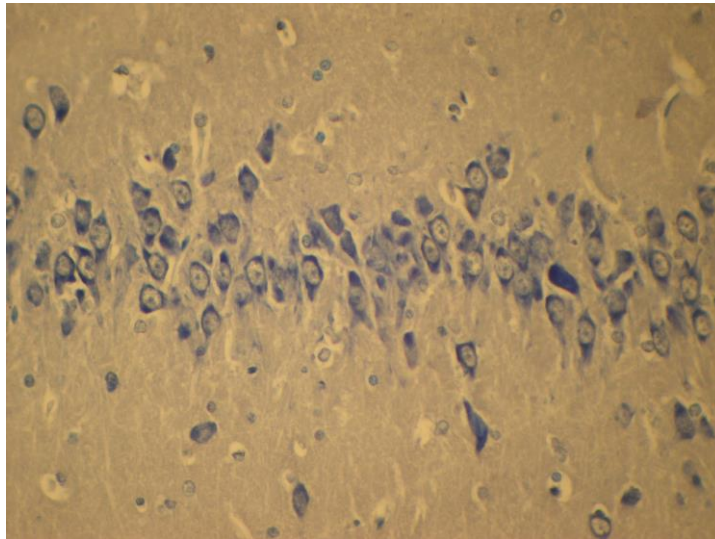


Рисунок 76. Значительное количество деформированных пикнотических нейронов пирамидного слоя СА3. Головной мозг крысы (комбинация двустороннего стеноза ОСА с экспериментальным СД на фоне лечения метформином и ситаглиптином). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение x 400

В церебральной коре изменения носили более значимый характер и выражались, прежде всего, в увеличении количества так называемых темных нейронов. Такие гиперхромные клетки характеризовались гиперхромной, интенсивно окрашенной цитоплазмой, в которых не определялись ядро и структуры цитоплазмы. Их тела угловатой или полигональной формы окружены ободком светлого пространства вследствие перичеселлюлярного отека.

В моторной и соматосенсорной областях церебральной коры изменения носили распространенный характер и захватывали нейроны II–V слоев. У отдельных животных, в поверхностных слоях коры (II–III) визуализировались довольно протяженные участки выраженных гиперхромных изменений нейронов и глиальных клеток (Рисунок 77).

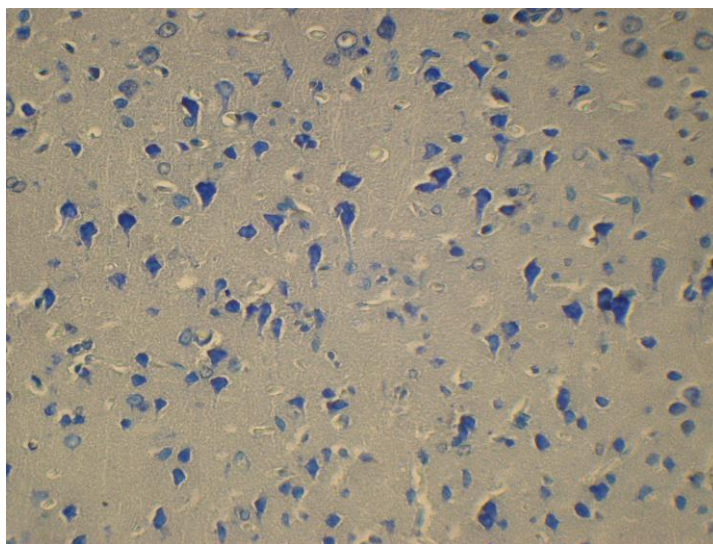


Рисунок 77. Увеличение сморщенных, гиперхромных нейронов коры больших полушарий. Моторная область коры головного мозга крысы (комбинация двустороннего стеноза ОСА с экспериментальным СД на фоне лечения метформином и ситаглиптином). Окраска тионином по методу Ниссля. Увеличение $\times 400$

Таким образом, светооптическое исследование экспериментального материала свидетельствует об отсутствии значимых патоморфологических изменений структур головного мозга крыс при моделировании месячного экспериментального СД. В группе животных с частичной двусторонней перевязкой ОСА наблюдались выраженные признаки нейродегенеративных процессов. Наиболее тяжелые изменения, вплоть до развития фокусов кортикальных некрозов наблюдались в моторных и, в меньшей степени, сенсомоторных отделах церебральной коры. В структурах лимбической системы (CA1 и CA3 поля дорсального и вентрального гиппокампа) преобладали слабо и/или умеренно выраженные патоморфологические изменения, в большинстве случаев, сводящиеся к гиперхромии цитоплазмы и отростков, изменению формы перикарионов и усилению базофилии ядер нейронов пирамидного слоя. Обращает на себя внимание то, что комбинирование месячного СД с двусторонней перевязкой ОСА приводило к некоторому изменению патоморфологической картины по сравнению с группой животных со стенозом ОСА, но без СД. Данные изменения касались

преимущественно структур лимбической системы, где в СА1, и особенно в СА3, существенно возростала численная плотность нейронов с тяжелыми нейродегенеративными изменениями.

Изучение морфологических изменений структур головного мозга при комбинированном экспериментальном воздействии (СД с частичной двусторонней перевязкой ОСА) на фоне фармакологической коррекции продемонстрировало следующие результаты. Изолированная фармакокоррекция ситаглиптином и метформином не оказывала существенного протективного эффекта в отношении структур гиппокампа. Снижение выраженности патогистологических изменений отмечалось только при комбинированном лечении (ситаглиптин+метформин). Обращает на себя внимание тот факт, что в церебральной коре наибольшее количество клеток с нейродегенеративными изменениями наблюдалось на фоне лечения ситаглиптином (моторная кора) и метформином (соматосенсорная).

Обобщая морфологические и морфометрические данные по различным структурам головного мозга (Таблица 18), можно сделать вывод о том, что наиболее значимое снижение выраженности дегенеративных изменений наблюдалось при лечении соединением ZB-16, а также его комбинацией с ситаглиптином и метформином. Морфометрический анализ свидетельствует о том, что в отношении СА3 гиппокампа и моторных отделов церебральной коры наибольшую эффективность продемонстрировало как изолированное (только ZB-16), так и комбинированное с метформином или ситаглиптином лечение.

Таблица 18

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

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

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

ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ

СД являются одной из ведущих причин заболеваемости, смертности и инвалидизации людей в большинстве стран мира. Темпы распространения этого заболевания не поддаются контролю даже ведущими медико-профилактическими службами. Это, безусловно, связано с урбанизацией, снижением физической активности человека и увеличением потребления в пищу высококалорийных продуктов, что приводит к нарастанию дисбаланса между потребляемой и расходуемой энергией. Очевидно, что проблема эффективной профилактики и лечения нарушений углеводного обмена является не только медицинской, поскольку ее наличие влечет за собой тяжелое экономическое и социальное бремя. Осложнения СД приводят к ранней и зачастую тяжелой инвалидизации пациента, накладывают серьезные ограничения на привычный образ жизни, пациент часто лишается возможности экономической деятельности и становится иждивенцем для государства, общества и родственников. Снижение интеллектуальной функции и возникновение депрессивных состояний не только усугубляют описанные выше процессы, но и существенно ограничивают возможности их медицинской коррекции.

Фармакотерапия фактически является единственным эффективным способом профилактики и лечения пациентов с СД, поскольку изменение образа жизни, рациона питания, увеличение физической активности не всегда эффективно, а проведение бариатрических операций в большинстве случаев невозможно или, в силу определенных причин, не позволяет достичь планируемых результатов.

В настоящее время фармацевтический рынок гипогликемических лекарственных средств достаточно разнообразен, на нем присутствует несколько классов препаратов, отличающихся механизмами действия, лекарственной формой, ценой и составом входящих в них активных веществ.

Несмотря на кажущееся разнообразие лекарственных препаратов, выбор врача затруднен из-за их разной эффективности, режима приема, стоимости и возникающих побочных эффектов. В многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях установлена значимая роль гипо- и гипергликемии в развитии сердечно-сосудистых, неврологических, дементных и депрессивных состояний, значительно осложняющих возможность проведения эффективной фармакотерапии. Поэтому эффективность антидиабетического средства оценивается уже не только с позиции контроля гипергликемии, но и с точки зрения наличия у него дополнительных положительных эффектов, предупреждения микро- и макроангиопатий и сердечно-сосудистых рисков, предупреждения нейро- и когнитивных патологий, метаболических нарушений. Так, препараты производные сульфонилмочевины и глитазоны обладают низкой стоимостью и высокой эффективностью, но часто вызывают гипогликемические состояния и увеличение массы тела. Применение метформина и ингибиторов α -глюкозидаз сопровождается желудочно-кишечными расстройствами, что снижает приверженность пациента рекомендациям врача. Ингибиторы ДПП-4 в монотерапии применяются редко, поскольку обладают умеренной эффективностью, при этом препараты данной группы мало доступны для широкого применения с точки зрения стоимости. Агонисты ГПП-1 являются одними из самых эффективных лекарственных препаратов для лечения СД, обладают большим числом положительных плеiotропных эффектов, но в то же время имеют существенные ограничения из-за способа применения, возникающих побочных эффектов (аллергические реакции, желудочно-кишечные расстройства) и высокую стоимость, что в совокупности существенно ограничивает возможность их широкого применения. Одна из последних групп лекарственных средств для лечения СД, которая появилась на фармацевтическом рынке, это блокаторы реабсорбции глюкозы в почках. Как и агонисты ГПП-1, они являются наиболее эффективными, снижая уровень глюкозы в крови, уменьшая массу тела, оказывая профилактику

сердечно-сосудистых осложнений, но их применение сопряжено с развитием нежелательных явлений (желудочно-кишечные, аллергические реакции) и также экономически затратно. Применение инсулина и его аналогов наряду с высокой эффективностью сопряжено с увеличением массы тела пациентов и развитием инсулинрезистентности. Таким образом, разработка новых оригинальных отечественных гипогликемических лекарственных средств, не уступающих по эффективности и безопасности импортным аналогам, является одной из приоритетных задач фармакологии. Необходимо отметить, что большинство современных оригинальных лекарственных средств пациент имеет возможность получить только коммерческим путем, поэтому его выбор, как правило, ограничивается лекарственными препаратами с низкой стоимостью, что неизбежно негативно отразится на эффективности и безопасности лечения.

Инкретиномиметики являются относительно молодым классом гипогликемических препаратов и на фармацевтическом рынке представлены двумя группами препаратов, отличающихся по механизму влияния на инкретиновую систему. Их история началась с открытия инкретинового эффекта, суть которого сводится к обеспечению глюкозозависимой секреции инсулина по мере поступления глюкозы из просвета кишечника в кровоток. Этот эффект был обнаружен во второй половине XX века, после того как в 1906 году Moore и соавт. предположили наличие в экстракте двенадцатиперстной кишки гормона с гипогликемическим эффектом, которому в 1932 г. La Barre присвоил название «инкретин». Непосредственно инкретиновый эффект был открыт в экспериментах, проводимых Elrick и соавт. в 1964 г., в ходе которых выяснилось, что при пероральном тесте толерантности к глюкозе секреция инсулина намного более выражена, чем при внутривенном. В дальнейшем были установлены структуры, физиологическая роль и метаболизм основных инкретинов, а также фермент, ответственный за их деградацию – DPP-4. Рядом исследователей было предположено, что ингибирование этого фермента позволит пролонгировать

активность основного инкретина, что вызовет гипогликемическое действие и в 2006 году на мировом фармацевтическом рынке появился препарат ситаглиптин, выпускаемой компанией Merck & Co под названием Янувия. В настоящее время широко известно 17 активных молекул с выраженной ингибирующей активностью в отношении ДПП-4, некоторые являются общепризнанными и распространяются по всему миру (ситаглиптин, вилдаглиптин, саксаглиптин, линаглиптин, алоглиптин, госоглиптин), некоторые доступны только в ограниченном числе стран. Основные различия между ингибиторами ДПП-4 заключаются в их селективности к ферменту, от которой в значительной степени зависит доза, в которой они применяются, их фармакокинетический профиль, наличие и выраженность побочных эффектов.

Другую группу гипогликемических средств, механизм действия которых связан с влиянием на инкретиновую систему и которые устойчивы к действию ДПП-4, представляет собой синтетические аналоги нативного ГПП-1. Первым препаратом этой группы стал зарегистрированный компанией Эли Лилли энд Компани под торговым названием Баета – Эксенатид, созданный после открытия этого соединения и выяснения его биологической роли в слюне аризонского ядозуба. Эксенатид является первым представителем своей фармакологической группы, но в результате низкой гомологичности последовательности аминокислот (только на 53% гомологичен человеческому ГПП-1) его подкожное введение провоцирует возникновение аллергических реакций. В настоящее время разработаны синтетические агонисты ГПП-1, практически полностью повторяющие последовательность аминокислот человеческого гормона. Так, Лираглутид и Албиглутид на 97% гомологичны человеческому ГПП-1. Синтетические агонисты рецепторов ГПП-1 отличаются между собой гомологичностью с человеческим ГПП-1, а также фармакокинетическими параметрами, их принято условно разделять на прандиальные (короткого действия) с режимом дозирования 2 и 1 раз в день (эксенатид и ликсисенатид соответственно), а

также непрандиальные (длительного действия) с режимом дозирования 1 раз в день (лираглутид) и 1 раз в неделю (эксенатид LAR, албиглутид, дулаглутид). Более десятка аналогов ГПП-1 и низкомолекулярных агонистов рецепторов ГПП-1 в настоящее время проходят клинические испытания. Основные направления повышения эффективности применения новых агонистов рецепторов ГПП-1 связаны с увеличением интервалов между инъекциями от 1 (semaglutide, glymera) до 2 или 4 недель (ITCA 650, efpeglenatide, VRS 859) и созданием лекарственной формы для перорального приема (NN9924, NN9926, NN9927, TTP054, TTP273, ZYOG1, ARI-1732TS).

Таким образом, в настоящее время фармацевтические препараты способны снижать деградацию вырабатываемых в организме инкретинов или вводить их синтетические аналоги. Применение инкретиномиметиков помимо достижения хорошего гипогликемического эффекта сопровождается снижением массы тела, риска развития сердечно-сосудистых осложнений и некоторыми другими плеiotропными эффектами. В то же время наиболее эффективные препараты класса – это синтетические агонисты ГПП-1, являются дорогостоящими, имеют только инъекционную лекарственную форму и обладают рядом побочных эффектов, что в совокупности существенно ограничивает их широкое применение.

В ходе реализации проекта геном человека была выделена группа рецепторов, активация которых вызывала повышение секреции инкретинов и в большей степени основного, который в значительной мере отвечает за гипогликемическое действие – ГПП-1. Эти рецепторы располагаются в просвете кишечника, на L- и K-клетках и в физиологических условиях выступают в роли сенсоров на определенные компоненты пищи или продуктов ее ферментации. Стимуляция этих рецепторов приводит к высвобождению инкретинов, что может быть использовано с целью создания их агонистов, применение которых позволит добиться увеличения концентрации циркулирующих инкретинов и соответственно связанных с ними биологических эффектов. Такой подход кажется перспективным для

многих фармацевтических компаний, что выражается в значительном интересе, который они проявляют в поиске и разработке агонистов этих рецепторов. Тем более что синтетические агонисты ГПП-1 рецептора не подвергаются метаболизму под действием ДПП-4 и, в результате, не образуется активный метаболит ГПП-1 (9-36) амид, который обладает гипогликемическим, вазоактивным кардио- и эндотелиопротекторным действием. Помимо этого, как уже было отмечено выше, рецепторы, регулирующие секрецию инкретинов, локализованы в просвете кишечника. Это определяют пероральную лекарственную форму для их агонистов, которая в отличие от инъекционной более физиологична и удобна пациентам.

Одним из рецепторов, регулирующих секрецию инкретинов, является GPR119, он является валидной мишенью для создания противодиабетических средств на основе его агонистов. С момента его открытия, установления физиологической роли, выявления эндогенных лигандов и разработки первых синтетических агонистов прошло более 15 лет. В настоящее время многие крупные фармацевтические компании прикоснулись к разработке синтетического агониста данного рецептора, но несмотря на позитивные результаты многих молекул в доклинических исследованиях, их клиническая апробация завершилась неудачами. Несмотря на то, что многие молекулы кандидаты, в клинических исследованиях в целом оказывали удовлетворительное гипогликемическое действие и хорошо переносились пациентами, ни одна так и не вышла на фармацевтический рынок в качестве лекарственного препарата. При этом необходимо отметить, что у многих соединений, проявляющих агонистическую активность в отношении GPR119, отмечается их влияние на снижение массы тела, что особенно важно, учитывая связь диабета и ожирения. Длительные постмаркетинговые исследования применения препаратов из группы иДПП-4 не выявили их влияние на массу тела, что не дает им дополнительного преимущества перед другими гипогликемическими средствами. Способность снижать массу тела у аГПП-1 была отмечена в доклинических исследованиях эксенатида. В

клинических исследованиях было обнаружено, что применение лираглутида позволяет не только снизить концентрацию глюкозы в крови, но и массу тела пациентов. В настоящее время лираглутид применяется не только как препарат для лечения СД2, но и как средство для терапии ожирения. Широкое распространение этих препаратов ограничивается их высокой стоимостью и только инъекционной формой выпуска. Очевидно, что чем выше агонистическая активность соединения в отношении GPR119, тем выше продукция ГПП-1 и соответственно более выражены эффекты, им свойственные, в том числе способность снижать массу тела. В отличие от аГПП-1 агонисты GPR119 разрабатываются в качестве лекарственных форм для перорального применения, что несомненно будет более удобно для врачей и пациентов.

При планировании исследования гипогликемического действия новых агонистов GPR119 нами были проанализированы доступные в открытой научной литературе структуры и данные доклинических и клинических исследований. В результате проведенного анализа, химиками из ЗАО ИИХимРар была разработана, а затем и синтезирована серия соединений, предположительно обладающих агонистической в отношении GPR119 активностью. После стандартизации и описания полученные соединения были первично протестированы на наличие и выраженность агонистической активности, определены параметры растворимости, токсичности в отношении кардиомиоцитов, устойчивости к липосомальным ферментам. Проведение данных работ позволило выявить соединения лидеры, которые обладают высокой агонистической активностью к GPR119, не проявляют признаков кардиотоксичности, что особенно важно после публикации результатов клинического исследования, в котором один из ингибиторов ДПП-4 повышал риск смерти от причин, связанных с нарушением работы сердца. Также в результате первичного скрининга соединений на выборочные параметры ADME были отсеяны те, которые малоустойчивы к метаболизму в печени, т.е. предположительно их метаболизм будет слишком

быстрый, что потребует частого применения и в более высокой дозе, что нежелательно из-за потенциальной трудности технологии получения субстанции и готовой лекарственной формы, высокой стоимости и неудобств для пациента.

Синтезированные и прошедшие первичный скрининг соединения были протестированы на наличие и выраженность гипогликемического действия в трех дозах – 0,1; 1 и 10 мг/кг, в которых оно перорально вводилось животным с экспериментальным СД.

В настоящее время в мире существует достаточно ограниченный набор моделей, используя которые можно воспроизвести на экспериментальных животных патологию, валидную таковой у человека. Так, в экспериментальной практике у нас и за рубежом используется несколько способов моделирования СД. Наиболее часто упоминающийся в научной литературе – это гипергликемия, моделируемая однократным или курсовым введением различных доз стрептозотоцина на фоне никотинамида, или без него. Стрептозотоцин вызывает дисфункцию β -клеток поджелудочной железы, которая со временем переходит в деструкцию, а затем, очевидно, происходит медленное восстановление β -клеточной массы, о чем свидетельствует наблюдаемое у животных, не получавших лечения, постепенное, в течение нескольких недель, снижение концентрации глюкозы в крови.

Наиболее валидной считается модель СД, вызываемого длительным содержанием экспериментальных животных в условиях высокожировой и калорийной диеты, но ее воспроизведение сопряжено с большим количеством трудностей, в первую очередь финансовыми, временными и материальными. На наш взгляд, эта модель подходит для фундаментальных исследований и ограничено применима для скрининга противодиабетических средств.

Альтернативой введению стрептозотоцина может служить аллоксановая интоксикация, но ее используют достаточно редко, поскольку уровень развивающейся гипергликемии трудно предсказуем.

В наших исследованиях мы использовали никотинамид-стрептозотин-индуцированную модель СД. Все формируемые экспериментальные группы до начала лечения исследуемыми веществами были сопоставимы по уровню гипергликемии. Учитывая, что гипогликемическое действие средств с инкретиновой активностью является инсулинопосредованным, что предполагает частичное наличие жизнеспособных и функционирующих β -клеток, для оценки противодиабетических свойств соединений с преимущественно инкретиномиметическим механизмом действия эта модель наиболее предпочтительна.

Пероральное введение агонистов GPR119 intactным животным не приводило к развитию выраженного гипогликемического эффекта, что доказывает отсутствие у соединений с подобным механизмом действия возможности вызывать гипогликемическое состояние. Курсовое, пероральное введение всех исследуемых агонистов GPR119 приводило к снижению концентрации глюкозы, измеренной натощак, но более выраженная компенсация нарушений углеводного обмена наблюдалась на фоне применения соединения под лабораторным шифром ZB-16. Результаты скрининговой серии экспериментов удалось воспроизвести. Так, при проведении исследования гипогликемического действия различных доз соединения ZB-16 у животных с экспериментальным СД было обнаружено, что его пероральное курсовое введение оказывает гипогликемическое действие, уменьшая концентрацию глюкозы натощак и ускоряя ее утилизацию в ходе проведения ПТТГ. Наиболее эффективной оказалась доза 1 мг/кг, что совпадает с ранее полученными данными.

Известно, что препараты, влияющие на систему инкретина и тем более потенциально вызывающие увеличение концентрации наиболее активного из

них, могут влиять на процессы, связанные с пищевым поведением и изменением массы тела. Поэтому на следующем этапе нашей работы мы решили оценить влияние нового агониста GPR119 на массу тела и некоторые параметры метаболизма животных с ожирением, длительно содержавшихся на высокожировой и калорийной диете. В эксперимент были отобраны старые животные, поскольку у них вызвать ожирение путем модификации привычного рациона питания оказалось легче. Старые животные менее активны, но потребляют пищи больше, чем молодые, что при замене сбалансированного корма на высококалорийный играет, очевидно, значимую роль в скорости развития ожирения. После развития ожирения животным курсом перорально вводили соединение ZB-16, что привело к среднему снижению массы тела на 4%, в то время как те, которым вместе с диетой давали плацебо, прибавили в весе. Одним из очевидных механизмов, благодаря которым соединение ZB-16 снижало массу тела экспериментальных животных, является его влияние на аппетит. Так, при анализе количества потребляемого корма животными, которым перорально вводили соединение ZB-16, было отмечено, что оно в среднем было минимальным среди всех животных, участвовавших в эксперименте. Необходимо отметить, что пероральное введение агониста GPR119 по выраженности снижения массы тела было сопоставимо с референтным препаратом метформин.

На следующем этапе исследования было оценено влияние соединения ZB-16 и его комбинации с метформином на процесс формирования ожирения, но у молодых животных. Данный эксперимент был спланирован по нескольким причинам. Во-первых, был учтен тренд на омоложение ожирения, что связано с увеличением калорийности питания и одновременным снижением физической активности. Во-вторых, необходимо отметить, что обнаруженное на старых животных сниженное на фоне введения агониста GPR119 потребление корма может быть перспективным подходом в попытке коррекции объема потребления пищи, что важно для

профилактики или замедления развития ожирения. Использование комбинации исследуемого соединения и метформина продиктовано тем, что эндокринологи нередко назначают этот препарат пациентам с избыточной массой тела, но у которых не установлен диагноз СД. Также метформин является препаратом первой линии для лечения СД, в том числе и у пациентов с ожирением. Как известно, гипогликемические препараты редко применяются в монотерапии ввиду их не всегда высокой эффективности, а также поскольку средств для лечения ожирения в настоящее время явно недостаточно, мы решили оценить потенциал применения соединения ZB-16 и метформина в комбинации в качестве средства, препятствующего развитию ожирения. Для этого у молодых животных обычный, стандартный комбикорм был заменен на пищу с повышенным содержанием жиров и углеводов. В ходе экспериментального исследования было выяснено, что у всех групп животных, которым курсом вводили соединение ZB-16, масса тела была меньше, чем в группе, не получавшей лечение. При анализе пищевого поведения этих животных было отмечено, что суммарное количество корма, съедаемое животными за 3 дня, было меньше, чем в группах, получавших лечение, но без ZB-16. Это наблюдение подтверждает верность гипотезы, что соединение ZB-16 подобно миметикам инкретиновых рецепторов снижает потребление пищи и тем самым его применение с целью снижения массы тела может быть полезно. Комбинированное курсовое введение ZB-16 и метформина более эффективно предотвращало прибавку массы тела экспериментальных животных, чем каждое соединение в отдельности. Введение метформина практически не влияло на потребление корма животными, однако масса тела на фоне его применения была меньше, чем у тех, которым вводили ZB-16, что, очевидно, связано с его влиянием на уменьшение инсулинрезистентности и продукции глюкозы печенью. Более выраженное протективное действие комбинации метформина и соединения ZB-16, очевидно, является следствием суммации их эффектов, имеющих разные механизмы действия. В ходе экспериментального исследования было

обнаружено, что суммация эффектов метформина и соединения ZB-16 отмечается и в их более выраженном влиянии на компенсацию нарушений углеводного обмена, которые заключались в повышенной концентрации глюкозы в крови, измеренной натощак, и медленной ее утилизацией при проведении ПТТГ. Изучение липотропных свойств исследуемого агониста показало, что все варианты проводимой терапии положительно влияют на липидный профиль лабораторных животных, содержащихся в условиях высокожировой и калорийной диеты. На завершающем этапе данного исследования у животных оценивалась эндотелиальная функция, а также был проведен подсчет циркулирующих эндотелиоцитов. Было обнаружено, что ни мозговой кровоток, ни число циркулирующих эндотелиоцитов статистически не различалось у животных всех исследуемых групп, что показывает отсутствие очевидных проявлений эндотелиальной дисфункции. В то же время проведение провокационных проб путем стимулирования секреции NO эндотелиальными клетками ацетилхолином выявило, что у животных, которые содержались на диете и не получали лечения, ответ на введение ацетилхолина был значимо ниже, чем у животных, получавших терапию. Базальная секреция NO эндотелием, выявляемая по реакции на введение L-NAME у животных контрольной группы, также была ниже. У всех животных, получавших терапию с началом диеты, уровень мозгового кровотока и выраженность эндотелийзависимых реакций были на уровне, сопоставимом с таковым в интактной группе. Таким образом, соединение ZB-16 не только снижает массу тела животных с ожирением и предотвращает ее увеличение при увеличении каллоража и жирности потребляемой пищи, компенсирует возникающие нарушения углеводного обмена, но и предотвращает развитие эндотелиальной дисфункции, что особенно важно для пациентов с СД, ожирением и метаболическим синдромом из-за высокого риска возникновения сердечно-сосудистых осложнений.

Проведенные исследования показывают, что новый агонист GPR119, соединение ZB-16 при пероральном введении оказывает выраженное

гипогликемическое действие у животных с экспериментальным СД, а также снижает или препятствует увеличению массы тела у животных с ожирением или при начале терапии одновременно с увеличением калорийности и жирности пищи.

Выявление механизмов действия соединения ZB-16 подтвердило его способность увеличивать секрецию ГПП-1 и инсулина, а также подавлять высвобождение глюкагона. Повышение секреции ГПП-1 должно рассматриваться не только с позиции его влияния на концентрацию инсулина и глюкозы, но и с точки зрения оказываемых им плеiotропных эффектов. Курсовое введение соединения ZB-16 животным с ЭСД очевидно, оказывало протективное действие в отношении поджелудочной железы, о чем свидетельствуют данные морфометрии и иммуногистохимии. Наличие большего, чем в контрольной группе инсулин-позитивного материала, а также более/менее интенсивные процессы пролиферации/апоптоза свидетельствуют о значимом защитном действии соединения ZB-16, очевидно за счет панкреопротективных эффектов ГПП-1 [Yoshida S., 2011; Zhao X., 2015]. Необходимо отметить, что цитопротективное действие аГПП-1, реализуемое путем увеличения Ki-67 отмечено не только в отношении клеток поджелудочной железы, но также в почках [Zhao X., 2015], что может быть важным для профилактики осложнений СД. Протективные свойства соединения ZB-16 могут реализовываться вследствие активации рецептора GPR119 в клетках поджелудочной железы, физиологическая роль которого там в настоящее время объяснена не полностью. Большое число инсулин-секретирующих клеток поджелудочной железы у животных, курсом получавших соединение ZB-16, может быть связано также со способностью ГПП-1 и, возможно, агониста GPR119 инициировать переход α -клеток в β -клетки при недостатке последних, что описано в научной литературе [Thorel F., 2010]. Переход глюкагон-продуцирующих клеток в инсулин-продуцирующие при возникающем недостатке последних напоминает процесс, описанный для нервной ткани и названный впоследствии

нейропластичностью, суть которого заключается в подмене функции, ранее выполняемой погибшими клетками, соседними с ними, структурно и функционально целыми [Thorel F., 2010]. Таким образом, соединение ZB-16 не только глюкозозависимо увеличивает секрецию ГПП-1 клетками кишечника, но восстанавливает инсулинсекретирующую функцию клеток поджелудочной железы, что, очевидно, и является причиной более высокого высвобождения инсулина и наличия выраженного гипогликемического эффекта. Меньшая концентрация глюкагона у животных с ЭСД, которым длительно (в течение 28 дней) перорально вводили соединение ZB-16, также свидетельствует о его положительном действии в отношении компенсации нарушений углеводного обмена, а также о том, что оно, подобно аГПП-1 рецептора, подавляет секрецию глюкагона.

Наличие выраженного гипогликемического действия в совокупности с отсутствием риска развития гипогликемического состояния подтверждает целесообразность разработки агонистов GPR119 в качестве современных противодиабетических лекарственных средств. Терапевтический потенциал соединения ZB-16 возрастает после установления его способности снижать массу тела животных с ожирением или предотвращать его развитие, а также оказывать репаративное действие в отношении инсулинсекретирующих клеток поджелудочной железы. В ходе проведенных исследований также были обнаружены эндотелиопротективные свойства соединения ZB-16, выявленные на моделях СД и ожирения, наличие которых может иметь важное значение для пациентов с СД, имеющих высокий риск развития сердечно-сосудистых и цереброваскулярных осложнений.

Многочисленные исследования показывают целесообразность изучения церебропротективных препаратов или новых соединений с предполагаемой церебропротективной активностью, в условиях комбинированной патологии. Необходимость использования такой стратегии продиктована наличием большого количества неудачных трансляций и ошибочных предубеждений о наличии и выраженности

церебропротективных свойств веществ, успешно прошедших доклинические исследования при их тестировании в клинических условиях. Т.е. в доклинических условиях, когда большинство переменных находится под контролем экспериментатора, моделируется одно патологическое состояние и, как правило, на интактных молодых животных, у которых имеются большие резервы и возможности к регенерации и у которых исследователи зачастую наблюдают выраженное позитивное действие нового соединения. В условиях клинических испытаний новых соединений, в том числе и с церебропротективным действием, они вводятся пациентам с значительно более гетерогенным характером заболевания и нередко с комбинированной патологией. Цереброваскулярная болезнь редко возникает у пациентов среднего возраста и без наличия одного или нескольких, разных по степени значимости, факторов риска, таких как сахарный диабет, атеросклероз, артериальная гипертензия и эндотелиальная дисфункция [Кособян Е.П., 2012]. Т.е. условия тестирования соединений в клинических исследованиях практически полностью не соответствуют тем, в которых они были эффективны, что и является причиной неудачных клинических испытаний. Избежать этого и повысить информативность доклинических исследований можно путем проведения экспериментов на животных с преморбидным фоном, желательно часто встречающимся в клинических условиях, т.е. дизайн экспериментального исследования должен в максимальной степени быть приближен к клиническим ситуациям.

Как известно, основным и самым тяжелым осложнением СД является цереброваскулярная катастрофа или различные формы мозгового инсульта. На фоне СД инсульт развивается чаще и протекает тяжелее, чем у пациентов без диабета [Гудкова В.В., 2015; Гусев Е.И., 2014; Дедов И.И., 2015б]. Предшествующие или сопутствующие СД ожирение, метаболический синдром, атеросклероз, артериальная гипертензия и эндотелиальная дисфункция не только повышают риск и тяжесть цереброваскулярной патологии, но и существенно снижают эффективность мероприятий по

сохранению жизни и реабилитации таких пациентов [Ермолаева А.И., 2009; Какорин С.В., 2013].

В недавно проведенных исследованиях у одного из представителей аГПП-1 была отмечена способность снижать риск развития сердечно-сосудистых осложнений. Соединение ZB-16, как уже говорилось выше, может выгодно отличаться от аГПП-1 лекарственной формой для перорального приема, а также тем, что стимулирует секрецию собственных инкретинов, которые не только оказывают эффекты ГПП-1, но и метаболизируются под действием ДПП-4 с образованием активного метаболита, что не свойственно синтетическим аналогам ГПП-1. Поэтому нами было проведено исследование церебропротективной активности соединения ZB-16 и его комбинаций с метформином и ситаглиптином в условиях, когда цереброваскулярная патология была смоделирована у крыс с хронической гипергликемией, выраженность и длительность которой в наших предыдущих исследованиях вызывала тяжелую эндотелиальную дисфункцию [Воронков А.В., 2011, Тюренок И.Н., 2012б, 2013а].

Спустя 28 дней гипергликемии, сопровождающейся ежедневным пероральным введением соединения ZB-16 в том числе и в составе комбинированной терапии с метформином или ситаглиптином, у животных была смоделирована ОСМА. Необходимо отметить, что наличие гипергликемии значительно отягощает течение ишемии головного мозга [Гудкова В.В., 2015; Щепанкевич Л.А., 2012; Стаховская Л.В., 2014], что вызвало необходимость уменьшить время окклюзии сосуда более чем в два раза (до 30 минут) по сравнению с интактными животными [Бакулин Д.А., 2016]. Моделирование фокальной ишемии головного мозга приводило к появлению выраженного психоневрологического дефицита у экспериментальных животных. Широко применяющийся препарат, обладающий доказанным церебропротективным действием – цитиколин оказался неэффективным, что может быть связано с наличием у животных выраженной эндотелиальной дисфункции и оксидативного стресса,

обусловленных длительной гипергликемией и значительно отягощающих течение смоделированной ОСМА. Данное объяснение подтверждается тем, что у животных с ЭСД и ишемией головного мозга, но которые получали гипогликемическую терапию, тяжесть психоневрологического дефицита была меньше, а церебропротективный эффект цитиколина был выражен больше. Наличие гипергликемии и эндотелиальной дисфункции отягощает течение ишемии головного мозга, но уровень глюкозы до ее моделирования в группах, получавших соединение ZB-16 и метформин, отличался и был несколько ниже в последней. В то же время после моделирования ишемии симптомы психоневрологического дефицита у животных, которые получали метформин, были несколько тяжелее, чем у получавших соединение ZB-16, несмотря на известные эндотелиотропные свойства метформина. Это наблюдение наталкивает на мысль, что соединение ZB-16 обладает церебропротективным действием, связанным не только со снижением концентрации глюкозы в крови и выраженности эндотелиальной дисфункции. Механизм церебропротективного действия, обнаруженного у некоторых аГПП-1, полностью пока не ясен. Безусловно, он является следствием нескольких факторов, таких как снижение концентрации глюкозы, следовательно, и глюкозотоксичности, эндотелиопротекции, воспаления, участия в ряде процессов, регулируемых киназами, подавления оксидативного стресса, но и, возможно, за счет прямого взаимодействия с рецепторами к ГПП-1. Необходимо отметить, что соединение ZB-16, увеличивая секрецию ГПП-1, может оказывать церебропротективное действие по описанным выше механизмам, а также, возможно, взаимодействуя с рецептором GPR119, роль которого в головном мозге пока остается не выясненной. В данном эксперименте также было обнаружено, что у животных, которые получали соединение ZB-16, продуктов, вступивших в реакцию с тиобарбитуровой кислотой, в крови было меньше, а время до полного гемолиза эритроцитов больше, чем в группах, не получавших соединение ZB-16, в том числе и в составе комбинаций, что

свидетельствует о наличии глюкозозависимого механизма снижения оксидативного стресса у соединения ZB-16.

Необходимость разработки новых гипогликемических средств и терапевтических подходов в лечении СД очевидна. При анализе рынка лекарственных препаратов, применяемых при СД было закономерно обнаружено, что и в стоимостном, и в натуральном выражении реализуются, в основном, устаревшие лекарственные средства, отличающиеся невысокой стоимостью. Это связано, в первую очередь, с экономическими проблемами населения и систем здравоохранения. Особенно угрожающей эта проблема становится после оценки темпов роста числа больных СД в РФ и с учетом того, что заболевание чаще возникает и тяжелее лечится у социально незащищенных граждан, которые по экономическим причинам не могут изменить образ жизни и применять высокоэффективные лекарственные средства.

Среди препаратов, характеризующихся высоким удельным весом в структуре потребления, присутствуют те, применение которых ассоциируется с высоким риском развития гипогликемического состояния и увеличения массы тела, что повышает риск развития дементных нарушений и сердечно-сосудистых осложнений. Снижение когнитивных способностей приводит еще к большей десоциализации пациента и еще больше отягощает его материальное положение, часто провоцируя возникновение депрессивноподобных состояний, что в совокупности практически полностью делает невозможным проведение эффективной терапии болезни. Гипогликемические состояния и повышение массы тела препятствуют эффективности противодиабетической терапии и повышают риск развития тяжелых сердечно-сосудистых осложнений.

Экономически и, по всей видимости, терапевтически оправданной является стратегия создания комбинированных гипогликемических лекарственных средств, поскольку все мировые ассоциации экспертов по лечению СД сходятся во мнении о необходимости ранней интенсификации

фармакотерапии. Метформин, несмотря на длительную историю его изучения и применения, продолжает оставаться базовым препаратом для лечения СД, с назначения которого начинается терапия у большинства пациентов. Этот препарат, обладая уникальным механизмом действия, является одним из основных для создания эффективных комбинаций. Так, практически все рациональные, двойные комбинации метформина с другими гипогликемическими средствами, представленные в тактиках ведения пациентов с СД ведущими мировыми противодиабетическими ассоциациями, на сегодняшний момент доступны в виде одного препарата, что более выгодно и удобно пациенту. Как показывают результаты наших исследований, у соединения ZB-16 во всех тестах и экспериментах при комбинировании с метформином значительно повышалась эффективность, что является следствием суммации их эффектов и является экспериментальным обоснованием рациональности создания такой комбинации.

Лекарственные препараты из группы аГПП-1 и блокаторов реабсорбции глюкозы в почках хоть и являются одними из самых популярных среди исследователей, поскольку оказываемые ими эффекты не до конца изучены, а также самыми эффективными в отношении установления гликемического контроля, профилактики рисков сердечно-сосудистых осложнений и снижения массы тела, занимают невысокие позиции по объемам реализации ввиду их высокой стоимости, низкой информированности врачей и неудобств для пациента, связанных с их приемом и побочными эффектами.

В ходе настоящей работы были синтезированы, отобраны и проскринированы на предмет специфической активности ряд соединений, обладающих выраженной агонистической активностью в отношении GPR119. Т.е. была проведена оценка некоторых параметров первичной фармакодинамики, включающих установление в нескольких независимых сериях эксперимента эффективности на валидированной модели СД, в

исследованиях *in vitro* и *in vivo* подтвердилась концепция возможности использования агонистов GPR119 с целью снижения концентрации глюкозы, а также то, что реализация этого эффекта происходит путем стимулирования секреции ГПП-1. Проведен анализ зависимости эффективности по выраженности гипогликемического эффекта от применяемой дозы, установлена эффективная доза.

При проведении исследований были установлены некоторые элементы вторичной фармакодинамики, плеiotропные эффекты соединения, включающие снижение массы тела у животных с ожирением и препятствие ее увеличению у животных, переведенных на высококалорийное и жировое питание, а также эндотелиопозитивное и церебропротективное действие, очевидно, не полностью обусловленное гипогликемическим.

Выполненные токсикологические исследования указывают на высокую лекарственную безопасность соединения ZB-16, а спектр его потенциально полезных при СД эффектов позволяет предположить его высокий терапевтический потенциал.

В настоящее время у многих гипогликемических лекарственных средств обнаруживается влияние на систему инкретинов. Так, акарбоза и миглитол по некоторым данным вызывает увеличение циркулирующих инкретинов, применение метформина улучшает их секрецию путем сохранения инкретинсекретирующей функции клеток кишечника, каноглифлозин, блокируя транспорт глюкозы из кишечника, вызывает акарбозоподобный эффект, попутно стимулируя секрецию инкретинов, но препаратов, взаимодействующих с GPR119, на сегодняшний момент нет. Таким образом, нет оснований предполагать конкурентное или иное лекарственное взаимодействие на уровне рецептора, что важно с точки зрения уникальности механизма действия, определяющего, в том числе, и возможность комбинирования препаратов различных групп. Эффективность гипогликемического, эндотелио- и церебропротекторного действия, а также снижения или предупреждения увеличения массы тела при резком

повышении калорийности и жирности потребляемой пищи была определена также при комбинации соединения в том числе с препаратом метформин, где было отмечено четкое повышение эффективности и отсутствие каких-либо признаков негативного действия соединений друг на друга.

На основании представленных данных можно утверждать, что агонисты GPR119 имеют высокий терапевтический потенциал. Разработанное соединение обладает широким спектром биологической активности и отвечает современным требованиям, предъявляемым к противодиабетическим лекарственным средствам. Глюкозозависимое гипогликемическое действие, способность снижать массу тела, усиление репаративных процессов в β -клетках поджелудочной железы, эндотелио- и церебропротективное действие, а также возможность комбинирования с другими противодиабетическими средствами и пероральная лекарственная форма выгодно отличают соединение ZB-16.

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

6. Дипиарон при курсовом применении оказывает выраженное эндотелио- и церебропротективное действие на моделях острого и хронического нарушения мозгового кровообращения, воспроизведенных на фоне экспериментального СД, снижая тяжесть возникающего психоневрологического дефицита по шкалам Combs и D'Alecy и Garcia, сенсомоторные (уменьшая на 16% и 22% время обнаружения инородного предмета на лапах в адгезивном тесте и на 231% и 122% увеличивая латентный период первого падения и общее время удержания на вращающемся стержне) и когнитивные нарушения, повышая

эндотелийзависимую вазодилатацию мозговых сосудов (мозговой кровоток в ответ на введение ацетилхолина увеличивался на 28% против 14% в контрольной группе у животных с ОНМК).

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

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

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

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

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. «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.
4. 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.
5. Бакулин, Д.А. Окклюзия средней мозговой артерии у крыс линии Wistar с экспериментальным сахарным диабетом: выбор оптимальной продолжительности ишемии / Д.А. Бакулин// Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2016. - № 11-6. - С. 1040-1043.
6. Балаболкин, М.И. Инсулинорезистентность и ее значение в патогенезе нарушений углеводного обмена и сахарного диабета типа 2 / М.И. Балаболкин // Сахарный диабет. – 2002. – №1. – С.12-20.
7. Баркаган, З.С. Основы диагностики нарушений гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот. – М.: Ньюдиамед, 2001. – 285 с.
8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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.

12. Воронков А.В. Эндотелиальная дисфункция и пути ее фармакологической коррекции: дис. ... д-ра мед. наук: 14.03.06 / Воронков Андрей Владиславович. – Волгоград, 2011. – 237 с.

13. 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.

14. 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.

15. Галстян, К.О. Первый отечественный ингибитор ДПП-4 глосглиптин 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.

16. 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.

17. Гланц, С. Медико-биологическая статистика: [пер. с англ.] / С. Гланц – М.: Практика. – 1999. – 459 С.
18. 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.
19. ГОСТ Р 53434-2009. Принципы надлежащей лабораторной практики. – Введ. 2010-03-01. – М.: Стандартиформ, 2010.
20. Грицай, Н.Н. Система гемостаза при нарушении мозгового кровообращения / Н.Н. Грицай, В.П. Мищенко, В.А. Пинчук // Международный неврологический журнал. – 2006. – № 5. – С. 8-8.
21. 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.
22. Гусев, Е.И. Церебральный инсульт / Е.И. Гусев, М.Ю. Мартынов, П.Р. Камчатнов [и др.] // Consilium Medicum. – 2014. – №12. – С.13-17.
23. 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.
24. Данные ВОЗ по заболеваемости диабетом, 2016 “<http://www.who.int/diabetes/country-profiles/ru/>” (дата обращения 19.02.2018).
25. Дегтярь, Н.И. Эндотелий и системное воспаление: роль ядерных транскрипционных факторов и терапевтические возможности (обзор литературы) / Н.И. Дегтярь, Н.Д. Герасименко, М.С. Расин // Артериальная гипертензия. – 2016. – № 4 (48). – С.21-25.
26. Дедов, И.И. (а) 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.

27. Дедов, И.И. (б) 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.

28. Дедов, И.И. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Под редакцией И.И. Дедова, М.В. Шестаковой, А.Ю. Майорова. – 8-й выпуск / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, А.Ю. Майоров [и др.] // Сахарный диабет. – 2017. – Т.20, №1S. – С.1-121.

29. Дедов, И.И. Инкретины и их влияние на течение сахарного диабета 2 типа у пациентов с морбидным ожирением после бариатрических операций / И.И. Дедов, Ю.И. Яшков, Е.В. Ершова // Ожирение и метаболизм. – 2012. – Т.9, №2. – С.3-10.

30. Дедов, И.И. Инновационные технологии в лечении и профилактике сахарного диабета и его осложнений / И.И. Дедов // Сахарный диабет. – 2013. – №3. – С.4-10.

31. Дедов, И.И. (а) 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.

32. Дедов, И.И. (б) Экономические затраты на сахарный диабет 2 типа и его основные сердечно-сосудистые осложнения в Российской Федерации / И.И. Дедов, А.В. Концевая, М.В. Шестакова [и др.] // Сахарный диабет. – 2016. – №6. – С.518-526.

33. 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.

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. 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.

39. 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.

40. 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.

41. 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.

42. 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.

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

44. 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.

45. 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.

46. Могильницкая, Л.А. Повышение уровня эндотелиального моноцитаактивирующего пептида-II в сыворотке крови больных артериальной гипертензией в сочетании с сахарным диабетом 2-го типа и ожирением / Л.А. Могильницкая, Б.Н. Маньковский // Ожирение и метаболизм. – 2016. – Т.13, № 3. – С.49-53.

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. Орлова, Д.Д. Роль митохондриального морфогенеза в регуляции апоптоза / Д.Д. Орлова, В.Г. Трибулович, А.В. Гарабаджиу. [и др.] // Цитология. – 2015. – Т.57, №3. – С.184-191.

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 нейрореплетической 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. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О.Ю. Реброва. – М.: Медиасфера. – 2006. – 312 с.

55. Решетняк, М.В. Модель метаболического синдрома, вызванного кормлением фруктозой: патологические взаимосвязи обменных нарушений / М.В. Решетняк, В.Н. Хирмаков, Н.Н. Зыбина [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2011. – Т.11, №3. – С.23-27.

56. Романцова, Т.И. Эпидемия ожирения: очевидные и вероятные причины / Т.И. Романцова // Ожирение и метаболизм. – 2011. – Т.8, №1. – С.5-19.

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. Снигур, Г.Л. К вопросу стандартизации патогистологической диагностики сахарного диабета / Г.Л. Снигур, А.В. Смирнов // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2010. – №3. – С.112-115.

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. 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.

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. Стаховская, Л.В. Инсульт. Руководство для врачей. Под ред. Л.В. Стаховской, С.В. Котова. М.: Медицинское информационное агентство, 2014. – 400 с.

68. 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.

69. 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.

70. 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.

71. Ткачук, В.А. Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину / В.А. Ткачук, А.В. Воротников // Сахарный диабет. – 2014. – № 2. – С.29-40.

72. 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.

73. 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.

74. Тюренков, И.Н. (б) Сравнительная церебропротекторная активность магния оксидутирата, 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.

75. 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.

76. 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.

77. 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.

78. 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.

79. Чернецкий, Г.А. Способы определения резистентности эритроцитов / Г.А. Чернецкий. – Минск: Наука-Белорус, 2002. – 101 с.

80. 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.

81. Чубинидзе, А.И. К методике гистологического (морфологического) определения степени поражения центральной нервной системы / А.И. Чубинидзе // Архив патологии. – 1972. – № 11. – С. 77-78.

82. Шестакова, М.В. Инкретины в лечении сахарного диабета 2 типа / М.В. Шестакова // Клиническая фармакология и терапия. – 2012. – Т.21, №2. – С.59-65.

83. 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.

84. 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.

85. 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.

86. Ярек-мартынова, И.Р. Сахарный диабет и эндотелиальная дисфункция / И.Р. Ярек-мартынова, М.В. Шестакова // Сахарный диабет. – 2004. – №2. – С.48-52.

87. Al-Barazanji, K. Synergistic Effects of a GPR119 Agonist with Metformin on Weight Loss in Diet-Induced Obese Mice / K. Al-Barazanji, J. McNulty, J. Binz [et al.] // J Pharmacol Exp Ther. – 2015. – Vol.353, №3. – P.496-504.

88. Alexander, S.P. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: G protein-coupled receptors / S.P. Alexander, A.P. Davenport, E. Kelly // Br J Pharmacol. – 2015. – Vol. 172, № 24. – P.5744-869.

89. Amber, C.F. Di-peptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin protects vascular function in metabolic syndrome: possible role of epigenetic regulation / C.F. Amber, T.K. Zeynep, O. Evren [et al.] // Mol Biol Rep. – 2014. – Vol.41, №8. – P.4853-4863.

90. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes—2017: Summary of Revisions // Diabetes Care. – 2017. – Т. 40, №. Supplement 1. – P. S4-S5.

91. 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.

92. Anderson, A 11 β -HSD1 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes and cardiovascular disease / A. Anderson, B.R. Walker // *Drugs*. – 2013. – Vol.73, №13. – P.1385-1393.

93. Ansarullah, P.D.Activation of GPR119 Stimulates Human β -Cell Replication and Neogenesis in Humanized Mice with Functional Human Islets / P.D. Ansarullah, C. Free, J. Christopherson [et al.] // *J Diabetes Res*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1620821.

94. 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.

95. Aravindhnan, K. Cardioprotection Resulting from Glucagon-Like Peptide-1 Administration Involves Shifting Metabolic Substrate Utilization to Increase Energy Efficiency in the Rat Heart / K. Aravindhnan, W. Bao, M.R. Harpel [et al.] // *PLoS One*. – 2015. – Vol.10, №6. – P.e0130894.

96. 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.

97. Astrup, A. Effects of liraglutide in the treatment of obesity: a randomised, double-blind, placebo-controlled study / A. Astrup, S. Rössner, L. Van Gaal [et al.] // *The Lancet*. – 2009. – Vol.374, №9701. – P.1606-1616.

98. 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.

99. Avogaro, A. Dipeptidyl-peptidase 4 inhibition: linking metabolic control to cardiovascular protection / A. Avogaro, S. de Kreutzenberg, G. Fadini // *Curr Pharm Des*. – 2014. – Vol.20, №14. – P.2387-2394.

100. Bahne, E. Involvement of glucagon-like peptide-1 in the glucose-lowering effect of metformin / E. Bahne, M. Hansen, A. Brønden [et al.] // *Diabetes Obes Metab.* – 2016. – Vol.18, №10. – P.955-961.
101. Bakir, B. Functional Classification of G-Protein Coupled Receptors, Based on Their Specific Ligand Coupling Patterns. Applications of Evolutionary Computing. Springer Berlin Heidelberg. – 2006. – P. 1–12. “http://dx.doi.org/10.1007/11732242_1”. (дата обращения 19.02.2018).
102. Ban, K. Glucagon-like peptide (GLP)-1(9-36)amide-mediated cytoprotection is blocked by exendin(9-39) yet does not require the known GLP-1 receptor / K. Ban, K.H. Kim, C.K. Cho [et al.] // *Endocrinology.* – 2010. – Vol. 151, № 4. – P. 1520-1531.
103. Barf, T Arylsulfonamidothiazoles as a new class of potential antidiabetic drugs. Discovery of potent and selective inhibitors of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 / T. Barf, J. Vallgård, R. Emond [et al.] // *J Med Chem.* – 2002. – Vol.45, №18. – P.3813-3815.
104. Basu, A. Beneficial effects of ГПП-1 on endothelial function in humans: dampening by glyburide but not by glimepiride / A. Basu, N. Charkoudian, W. Schrage [et al.] // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* – 2007. – Vol.293, №5. – P.1289-1295.
105. Bertilsson, G. Peptide hormone exendin-4 stimulates subventricular zone neurogenesis in the adult rodent brain and induces recovery in an animal model of Parkinson's disease / G. Bertilsson, C. Patrone, O. Zachrisson // *J Neurosci Res.* – 2008. – Vol.86, №2. – P.326-338.
106. Bethesda, M.D. USRDS annual data report: Epidemiology of kidney disease in the United States. United States Renal Data System. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. - 2014. – P. 188–210
107. 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.

108. Born, G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal / G.V. Born // *Nature (Lond)*. – 1962. – Vol. 194. – P.927-929.
109. Bouet, V. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice / V. Bouet, M. Boulouard, J. Toutain [et al.] // *Nat Protoc*. - 2009. – Vol. 4, № 10. – P. 1560-1564.
110. Bourne, R.R. Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis / R.R. Bourne, G.A. Stevens, R.A. White [et al.] // *Lancet Global Health*. – 2013. – Vol.1. – P.e339-e349.
111. Boutant, M. SIRT1 metabolic actions: Integrating recent advances from mouse models / M. Boutant, C. Cantó // *Mol Metab*. – 2013. – Vol;3, №1. – P.5-18.
112. 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.
113. 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.
114. 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.
115. 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.
116. 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.
117. 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.

118. Chalkiadaki, A. High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction / A. Chalkiadaki, L. Guarente // *Cell Metab.* – 2012. – Vol.16, №2. – P.180-188.
119. Chen, H.C. Enhancing energy and glucose metabolism by disrupting triglyceride synthesis: Lessons from mice lacking DGAT1 / H.C. Chen // *Nutr Metab (Lond).* – 2006. – Vol. 3. – P. 10.
120. 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.
121. Cho, H. Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and obesity / H. Cho // *Vitam Horm.* – 2013. – Vol.91. – P.405-424.
122. Choi, S.H. Dipeptidyl peptidase-4 inhibition by gemigliptin prevents abnormal vascular remodeling via NF-E2-related factor 2 activation / S.H. Choi, S. Park, C.J. Oh [et al.] // *Vascul Pharmacol.* – 2015. – Vol.73. – P.11-19.
123. Christensen, M. The alpha-cell as target for type 2 diabetes therapy / M. Christensen, J.I. Bagger, T. Vilsbøll, F.K. Knop // *Rev Diabet Stud.* – 2011. – Vol.8, №3. – P.369-381.
124. 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.
125. 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.
126. Cornall, L.M. Is GPR119 agonism an appropriate treatment modality for the safe amelioration of metabolic diseases? / L.M. Cornall, M.L. Mathai, D.H. Hryciw, A.J. McAinch // *Expert Opin Investig Drugs.* – 2013. – Vol.22, №4. – P.487-498.
127. 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.

128. Coughlan, K.A. AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? / K.A. Coughlan, R.J. Valentine, N.B. Ruderman, A.K. Saha // Diabetes Metab Syndr Obes. – 2014. – Vol.7. – P.241-253.

129. Cox, H.M. Peptide YY is critical for acylethanolamine receptor Gpr119-induced activation of gastrointestinal mucosal responses / H.M. Cox, I.R. Tough, A.M. Woolston // Cell Metab. – 2010. – Vol. 11, № 6. – P. 532-542.

130. 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.

131. Dang, Q. Discovery of a series of phosphonic acid-containing thiazoles and orally bioavailable diamide prodrugs that lower glucose in diabetic animals through inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase / Q. Dang, Y. Liu, D.K. Cashion [et al.] // J Med Chem. – 2011. – Vol.54, №1. – P.153-165.

132. Darnton-Hill, I. Reducing consumption of sugar-sweetened beverages to reduce the risk of unhealthy weight gain in adults. 2014. "http://www.who.int/elena/titles/commentary/ssbs_adult_weight/en/" (дата обращения 19.02.2018).

133. 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.

134. Darsalia, V. (б) 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.

135. 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.

136. De Bruin, M.L. Anti-HERG activity and the risk of drug-induced arrhythmias and sudden death / M.L. de Bruin, M. Pettersson, R.H. Meyboom [et al.] // *Eur Heart J.* – 2005. – Vol.26, №6. – P.590-597.
137. DeFronzo RA, Ferrannini E, Zimmet P, Alberti KGMM, editors. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Wiley-Blackwell, Ltd; 2015. 1228 p.
138. Dong, Z. Comparative efficacy of five long-term weight loss drugs: quantitative information for medication guidelines / Z. Dong, L. Xu, H. Liu [et al.] // *Obes Rev.* – 2017.- Vol. 18, № 12. – P. 1377-1385.
139. El-Remessy, A.B. Peroxynitrite mediates diabetes-induced endothelial dysfunction: possible role of Rho kinase activation / El-Remessy AB, Tawfik HE, Matragoon S // *Exp Diabetes Res.* – 2010. – Vol. 2010. – P. 247861.
140. 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.
141. Engelstoft, M.S. Structural basis for constitutive activity and agonist-induced activation of the enteroendocrine fat sensor GPR119 / M.S. Engelstoft, C. Norn, , M. Hauge [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2014. – Vol. 171, № 24. – P. 5774-5789.
142. Eriksson L, Saxelin R, Röhl S, et al. Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Activation Does not Affect Re-Endothelialization but Reduces Intimal Hyperplasia via Direct Effects on Smooth Muscle Cells in a Nondiabetic Model of Arterial Injury. *J Vasc Res.* 2015;52(1):41-52. doi: 10.1159/000381097.
143. 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.
144. Erion, M.D MB06322 (CS-917): A potent and selective inhibitor of fructose 1,6-bisphosphatase for controlling gluconeogenesis in type 2 diabetes / M.D. Erion, P.D. van Poelje, Q. Dang [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2005. – Vol.102, №22. – P.7970-7975.

145. Fadini, G.P. Cardiovascular effects of DPP-4 inhibition: beyond GLP-1 / G.P. Fadini, A. Avogaro // *Vascular pharmacology*. – 2011. – T. 55, №. 1. – C. 10-16.
146. Floettmann, E. Prolonged inhibition of glycogen phosphorylase in livers of Zucker Diabetic Fatty rats models human glycogen storage diseases / E. Floettmann, L. Gregory, J. Teague [et al.] // *Toxicol Pathol.* – 2010. – Vol.38, №3. – P.393-401.
147. 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.
148. Freeman, S. Sensitivity of glycogen phosphorylase isoforms to indole site inhibitors is markedly dependent on the activation state of the enzyme / S. Freeman, J.B. Bartlett, G. Convey [et al.] // *Br J Pharmacol.* – 2006. – Vol.149, №6. – P.775-785.
149. Freret, T. Behavioral deficits after distal focal cerebral ischemia in mice: Usefulness of adhesive removal test / T. Freret, V. Bouet, C. Leconte [et al.] // *Behav Neurosci.* – 2009. – Vol. 123, № 1. – P. 224-230.
150. 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.
151. 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.
152. 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.
153. 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.

154. Godlewski, G. Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119 / G. Godlewski, L. Offertáler, J.A. Wagner, G. Kunos // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* – 2009. – Vol. 89, № 3-4. – P. 105-111.

155. 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.

156. 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.

157. 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.

158. Guardia-Laguarta, C. α -Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes / C. Guardia-Laguarta, E. Area-Gomez, C. Rüb [et al.] // *J Neurosci.* – 2014. – Vol.34, №1. – P.249-259.

159. 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.

160. He, L. Anti-inflammatory effects of exendin-4, a glucagon-like peptide-1 analog, on human peripheral lymphocytes in patients with type 2 diabetes / L. He, C.K. Wong, K.K. Cheung [et al.] // *J Diabetes Investig.* – 2013. – Vol.4, №4. – P.382-92.

161. 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.

162. Hladovec, J. Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions / J. Hladovec // *Physiologia bohemoslovaca*. – 1977. – Vol. 27, № 2. – P.140-144.
163. Hogan, A.E. Glucagon-like peptide 1 analogue therapy directly modulates innate immune-mediated inflammation in individuals with type 2 diabetes mellitus / A.E. Hogan, G. Gaoatswe, L. Lynch [et al.] // *Diabetologia*. – 2014. – Vol.57, №4. – P.781–784.
164. International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. 7th edn. 2015. Brussels: IDF, P. 144. www.idf.org/diabetesatlas. (дата обращения 19.02.2018).
165. Isberg, V. GPCRdb: an information system for G protein-coupled receptors / V. Isberg, S. Mordalski, C. Munk [et al.] // *Nucleic Acids Res*. – 2016. – Vol. 44, № D1. – P. D356-364.
166. 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.
167. Jendle, J. Weight loss with liraglutide, a once-daily human glucagon-like peptide-1 analogue for type 2 diabetes treatment as monotherapy or added to metformin, is primarily as a result of a reduction in fat tissue / J. Jendle, M.A. Nauck, D.R. Matthews [et al.] // *Diabetes Obes Metab*. – 2009. – Vol.11, №12. – P.1163-72.
168. Jia, G. Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Activation and Platelet Function: Beyond Glycemic Control / G. Jia, A.R. Aroor, J.R. Sowers // *Diabetes*. – 2016. – Vol.65, №6. – P.1487-1489.
169. Johnston, S.S. Evidence linking hypoglycemic events to an increased risk of acute cardiovascular events in patients with type 2 diabetes / S.S. Johnston, C. Conner, M. Aagren [et al.] // *Diabetes Care*. – 2011. - Vol. 34, № 5. – P. 1164-1170.
170. Kalyvas, A. Bariatric Surgery as Metabolic Surgery for Diabetic Patients / A. Kalyvas, K. Vlachos, M. Abu-Amara [et al.] // *Curr Pharm Des*. – 2014. – Vol.20, №22. – P.3631-3646.

171. Kang, M.Y. Peptide-1 Increases Mitochondrial Biogenesis and Function in INS-1 Rat Insulinoma Cells / M.Y. Kang, T.J. Oh, Y.M. Cho // *Endocrinol Metab* (Seoul). – 2015. – Vol.30, №2. – P.216-220.
172. 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.
173. Kim, M. GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure / M. Kim, M.J. Platt, T. Shibasaki [et al.] // *Nat Med*. – 2013. – Vol.19, №5. – P.567-575.
174. King, H. Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections / H. King, R.E. Aubert, W.H. Herman // *Diabetes Care*. – 1998. – Vol. 21. – P. 1414–1431
175. 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.
176. 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.
177. 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.
178. 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.
179. 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.

180. Lan, H. GPR119 is required for physiological regulation of glucagon-like peptide-1 secretion but not for metabolic homeostasis / H. Lan, G. Vassileva, A. Corona [et al.] // *J Endocrinol.* – 2009. – Vol.201, №2. – P.219-230.
181. 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.
182. Li, Y. Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver / Y. Li, S. Xu, A. Giles [et al.] // *FASEB J.* – 2011. – Vol.25, №5. – P.1664-1679.
183. Li, Y. Incretin-based therapy for type 2 diabetes mellitus is promising for treating neurodegenerative diseases / Y. Li, L. Li, C. Hölscher// *Rev Neurosci.* – 2016. – Vol. 27, № 7. – P. 689-711.
184. Liu, L. Protective effects of glucagon-like peptide 1 on endothelial function in hypertension / L. Liu, J. Liu, Y. Huang // *Journal of cardiovascular pharmacology.* – 2015. – T.65, №. 5. – P.399-405
185. Lønborg, J. Impact of system delay on infarct size, myocardial salvage index, and left ventricular function in patients with ST-segment elevation myocardial infarction / J. Lønborg, M.M. Schoos, H. Kelbæk [et al.] // *Am Heart J.* - 2012. - Vol. 164, № 4. - P. 538-546.
186. Lorber, D. GLP-1 Receptor Agonists: Effects on Cardiovascular Risk Reduction / D. Lorber // *Cardiovasc Ther.* – 2013. – Vol.31, №4. – P.238-249.
187. 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.
188. 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.

189. Maiorino, M.I. Cooling down inflammation in type 2 diabetes: how strong is the evidence for cardiometabolic benefit? / M.I. Maiorino, G. Bellastella, D. Giugliano, K. Esposito // *Endocrine*. 2017. – Vol. 55, № 2. – P. 360-365.
190. Marino, M.T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled GLP-1 (MKC253): proof-of-concept studies in healthy normal volunteers and in patients with type 2 diabetes / M.T. Marino, D. Costello, R. Baughman [et al.] // *Clin Pharmacol Ther.* – 2010. – Vol. 88, № 2. – P. 243-250.
191. Marino, M.T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled GLP-1 (MKC253): proof-of-concept studies in healthy normal volunteers and in patients with type 2 diabetes / M.T. Marino, D. Costello, R. Baughman [et al.] // *Clin Pharmacol Ther.* – 2010. – Vol. 88, № 2. – P. 243-250.
192. 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.
193. 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.
194. 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.
195. Medina, M. New insights into the role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease / M. Medina, J. Avila // *Expert Opin Ther Targets.* – 2014. – Vol.18, №1. – P.69-77.
196. Montoya C.P. The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats / C.P. Montoya, L.J. Campbell-Hope, K.D. Pemberton, S.B. Dunnett // *J Neurosci Methods.* – 1991. – Vol. 36, № 2-3. – P. 219-228.
197. Morales, P.E. GLP-1 promotes mitochondrial metabolism in vascular smooth muscle cells by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria coupling /

P.E. Morales, G. Torres, C. Sotomayor-Flores [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2014. – Vol.446, №1. – P.410-416.

198. 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.

199. Moynihan, K.A. Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice / K.A. Moynihan, A.A. Grimm, M.M. Plueger [et al.] // *Cell Metab.* – 2005. – Vol.2, №2. – P.105-117.

200. 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.

201. 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.

202. O'Rourke, B. Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection / B. O'Rourke // *Circ Res.* – 2004. – Vol.94. – P.420-432.

203. Oballa, R.M. Development of a liver-targeted stearyl-CoA desaturase (SCD) inhibitor (MK-8245) to establish a therapeutic window for the treatment of diabetes and dyslipidemia / R.M. Oballa, L. Belair, W.C. Black [et al.] // *J Med Chem.* – 2011. – Vol.54, №14. – P.5082-5096.

204. Odori, S. GPR119 expression in normal human tissues and islet cell tumors: evidence for its islet-gastrointestinal distribution, expression in pancreatic beta and alpha cells, and involvement in islet function / S. Odori, K. Hosoda, T. Tomita [et al.] // *Metabolism.* – 2013. – Vol.62. – P.70–78.

205. 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.

206. 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.

207. Oyama, J. Do incretins improve endothelial function? / J. Oyama, Y. Higashi, K. Node // Cardiovasc Diabetol. – 2014. – Vol.13. – P.21.

208. Park, Y.H. YH18421, a novel GPR119 agonist exerts sustained glucose lowering and weight loss in diabetic mouse model / Y.H. Park, H.H. Choi, D.H. Lee [et al.] // Arch Pharm Res. – 2017. – Vol.40, №6. – P.772-782.

209. Pfefferkorn, J.A. Strategies for the design of hepatoselective glucokinase activators to treat type 2 diabetes / J.A. Pfefferkorn // Expert Opin Drug Discov. – 2013. – Vol.8, №3. – P.319-330.

210. Pierce, C.G. High-content phenotypic screenings to identify inhibitors of *Candida albicans* biofilm formation and filamentation / C.G. Pierce, S.P. Saville, J.L. Lopez-Ribot // Pathog Dis. – 2014. – Vol.70, №3. – P.423-431

211. Pitocco, D. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes / D. Pitocco, F. Zaccardi, E. Di Stasio // Rev Diabet Stud. – 2010. Vol. 7, № 1. – P. 15-25.

212. Poelje, P.D. Fructose-1, 6-bisphosphatase inhibitors for reducing excessive endogenous glucose production in type 2 diabetes / P.D. Poelje, S.C. Potter, M.D. Erion // Handb Exp Pharmacol. – 2011. - № 203. – P. 279-301.

213. Poucher, S.M. Effects of saxagliptin and sitagliptin on glycaemic control and pancreatic β -cell mass in a streptozotocin-induced mouse model of type 2 diabetes / S.M. Poucher, S. Cheetham, J. Francis [et al.] // Diabetes Obes Metab. – 2012. – Vol. 14, № 10. – P. 918-926.

214. Purushotham, A. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation / A. Purushotham, T.T. Schug, Q. Xu [et al.] // Cell Metab. – 2009. – Vol.9, №4. – P.327-338.

215. Ramtohul, Y.K. SAR and optimization of thiazole analogs as potent stearyl-CoA desaturase inhibitors / Y.K. Ramtohul, C. Black, C.C. Chan [et al.] // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2010. – Vol.20, №5. – P.1593-1597.
216. 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.
217. 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.
218. Rohloff, C.M. DUROS technology delivers peptides and proteins at consistent rate continuously for 3 to 12 months / C.M. Rohloff, T.R. Alessi, B. Yang [et al.] // *J Diabetes Sci Technol.* – 2008. – Vol. 2, № 3. – P. 461-467.
219. 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.
220. Seifarth, C. Effectiveness of metformin on weight loss in non-diabetic individuals with obesity / C. Seifarth, B. Schehler, H.J. Schneider // *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* – 2013. – Vol.121, №1. – P.27-31.
221. Shah, U. Recent Advances in the Discovery of GPR119 Agonists. In: Jones RM, editors. *New Therapeutic Strategies for Type 2 Diabetes* / U. Shah, S. Edmondson, J.W. Szewczyk // Cambridge: Royal Society of Chemistry. - 2012. - P. 177-214.
222. Shigiyama, F. Effectiveness of dapagliflozin on vascular endothelial function and glycemic control in patients with early-stage type 2 diabetes mellitus: DEFENCE study / F. Shigiyama, N. Kumashiro, M. Miyagi [et al.] // *Cardiovasc Diabetol.* – 2017. – Vol.16, №1. – P.84.
223. 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.

224. 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.
225. Singh, S.S. Preclinical pharmacokinetics: an approach towards safer and efficacious drugs / S.S. Singh // *Curr Drug Metab.* – 2006. – Vol.7, №2. – P.165-182.
226. Smith, S.J. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat / S.J. Smith, S. Cases, D.R. Jensen [et al.] // *Nat Genet.* – 2000. – Vol.25, №1. – P.87-90.
227. Sun, G. Quantitative analysis of prevention effect of tetrandrine on pancreatic islet beta cells injury in rats / G. Sun, Y. Qi, Q. Pan // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* – 1997. – Vol. 77, № 4. – P. 270-273.
228. Szkudelski, T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model / T. Szkudelski // *Exp Biol Med (Maywood).* - 2012. - Vol. 237, № 5. – P. 481-490.
229. 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.
230. 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.
231. Thorel, F. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells in diabetic mice / F. Thorel, P.L. Herrera // *Med Sci (Paris).* – 2010. – Vol. 26, № 11. – P. 906-909.
232. 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.

233. Vaghasiya, J. Sitagliptin protects renal ischemia reperfusion induced renal damage in diabetes / J. Vaghasiya, N. Sheth, Y. Bhalodia, R. Manek // Regul Pept. – 2011. – Vol. 166, № 1-3. – P. 48-54.

234. Véniant, M.M. Discovery of a potent, orally active 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor for clinical study: identification of (S)-2-((1 S, 2 S, 4 R)-bicyclo [2.2. 1] heptan-2-ylamino)-5-isopropyl-5-methylthiazol-4 (5 H)-one (AMG 221) / M.M. Véniant, C. Hale, R.W. Hungate [et al.] // J Med Chem. – 2010. – Vol. 53, № 11. – P. 4481-4487.

235. Vetterli, L. Resveratrol potentiates glucose-stimulated insulin secretion in INS-1E beta-cells and human islets through a SIRT1-dependent mechanism / L. Vetterli, T. Brun, L. Giovannoni [et al.] // J Biol Chem. – 2011. – Vol.286, №8. – P.6049-6060.

236. Villanueva, C.J. Specific role for acyl CoA:Diacylglycerol acyltransferase 1 (Dgat1) in hepatic steatosis due to exogenous fatty acids / C.J. Villanueva, M. Monetti, M. Shih // Hepatology. – 2009. Vol. 50, № 2. – P. 434-442.

237. Voss, M.D. Discovery and pharmacological characterization of SAR707 as novel and selective small molecule inhibitor of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) / M.D. Voss, G. Zoller, H. Matter // Eur J Pharmacol. – 2013. – Vol. 707, № 1. – P. 140-146.

238. Wang, X.M. The emerging role of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in cardiovascular protection: current position and perspectives / X.M. Wang, Y.J. Yang, Y.J. Wu // Cardiovasc Drugs Ther. – 2013. – Vol.27, №4. – P.297-307.

239. 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.

240. 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.

241. Wiernsperger, N.F. Oxidative stress: the special case of diabetes / N.F. Wiernsperger // *Biofactors*. – 2003. Vol. 19, № 1-2. – P. 11-18.
242. World Health Organization (WHO): Diabetes Mellitus. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series 310. Geneva: WHO, 1965.
243. World Health Organization: WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus. Second report. Technical Report Series 646. Geneva:WHO, 1980.; World Health Organization: Diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group. Technical Report Series 727. Geneva: WHO, 1985, p. 727.
244. Wu, H. Circulating endothelial cells and endothelial progenitors as surrogate biomarkers in vascular dysfunction / H. Wu, H. Chen, P.C. Hu // *Clin Lab*. 2007;53(5-6):285-295.
245. Xiao-Yun, X. Glucagon-like peptide-1 improves proliferation and differentiation of endothelial progenitor cells via upregulating VEGF generation / X. Xiao-Yun, M. Zhao-Hui, C. Ke [et al.] // *Med Sci Monit*. – 2011. – Vol.17, №2.:BR35-41.
246. Xu, J. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction / J. Xu, M.H. Zou // *Circulation*. – 2009. – Vol.120, №13. – P.1266-1286.
247. 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.
248. Yang, R. Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences / R. Yang, L.A. Barouch // *Circ Res*. – 2007. – Vol.101, №6. – P.545-559.
249. Yoshida, S. The role of small molecule GPR119 agonist, AS1535907, in glucose-stimulated insulin secretion and pancreatic β -cell function / S. Yoshida, T. Ohishi, T. Matsui [et al.] // *Diabetes Obes Metab*. – 2011. – Vol.13, №1. – P.34-41.
250. Zeng, Y. The glucagon like peptide 1 analogue, exendin-4, attenuates oxidative stress-induced retinal cell death in early diabetic rats through promoting

Sirt1 and Sirt3 expression / Y. Zeng, K. Yang, F. Wang [et al.] // *Exp Eye Res.* – 2016. – Vol.151. – P.203-211.

251. 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.

252. 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.

253. Zhang, M. High-throughput screening for GPR119 modulators identifies a novel compound with anti-diabetic efficacy in db/db mice / M. Zhang, Y. Feng, J. Wang // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, № 5. – P. e63861.

254. Zhang, X.D. Pharmacological inhibition of diacylglycerol acyltransferase 1 reduces body weight gain, hyperlipidemia, and hepatic steatosis in db/db mice / X.D. Zhang, J.W. Yan, G.R. Yan [et al.] // *Acta Pharmacol Sin.* – 2010. – Vol.31, №11. – P.1470-1477.

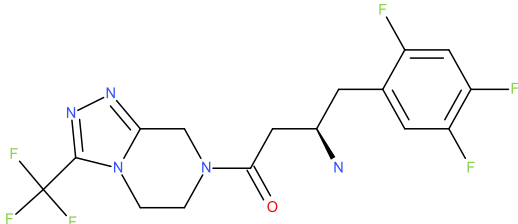
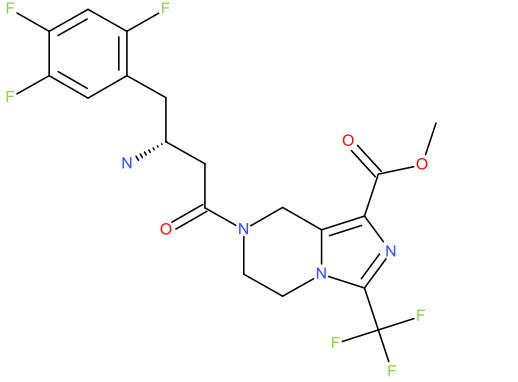
255. Zhao, L. Exendin-4 alleviates angiotensin II-induced senescence in vascular smooth muscle cells by inhibiting Rac1 activation via a cAMP/PKA-dependent pathway / L. Zhao, A.Q. Li, T.F. Zhou [et al.] // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2014. – Vol.307, №12. – P.1130-1141.

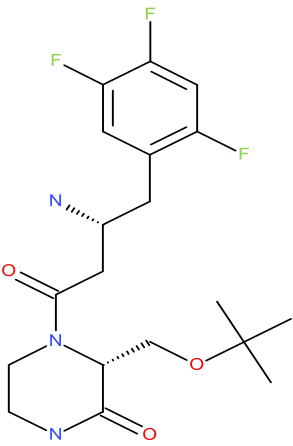
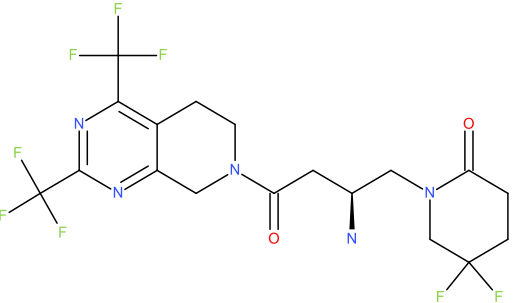
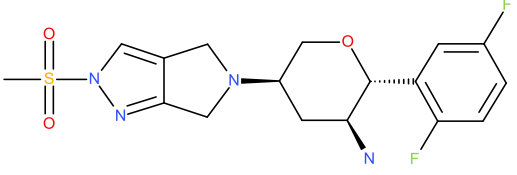
256. Zhao, T. Direct effects of glucagon-like peptide-1 on myocardial contractility and glucose uptake in normal and postischemic isolated rat hearts / T. Zhao, P. Parikh, S. Bhashyam [et al.] // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2006. – Vol.317, №3. – P.1106-1113.

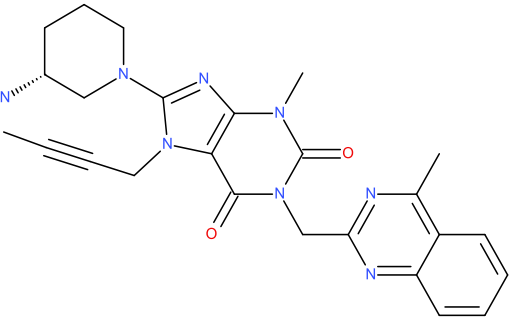
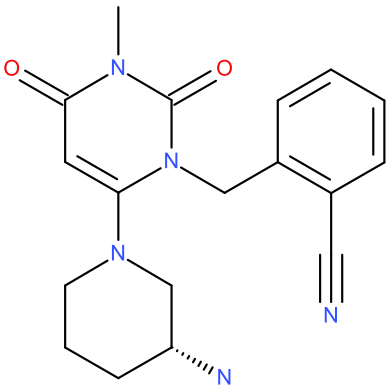
257. Zhao, X. Liraglutide inhibits autophagy and apoptosis induced by high glucose through GLP-1R in renal tubular epithelial cells / X. Zhao, G. Liu, H. Shen [et al.] // *Int J Mol Med.* – 2015. – Vol. 35, № 3. – P. 684-692.

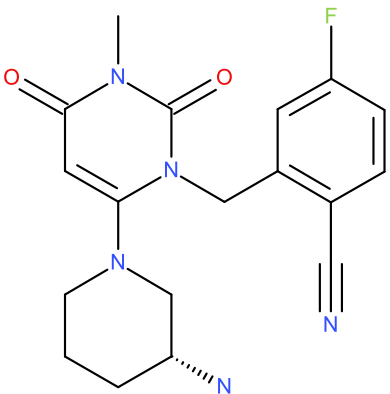
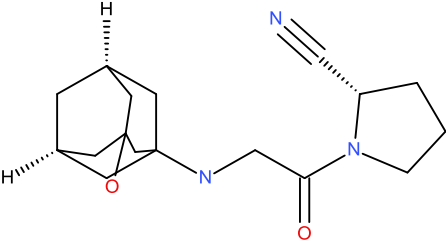
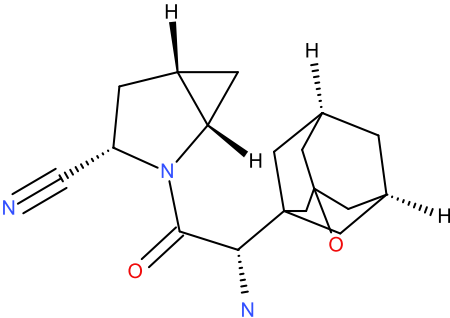
258. Zhu, H. The Neuroprotection of Liraglutide Against Ischaemia-induced Apoptosis through the Activation of the PI3K/AKT and MAPK Pathways / H. Zhu, Y. Zhang, Z. Shi [et al.] // *Sci Rep.* – 2016. – Vol.6. – P.26859.

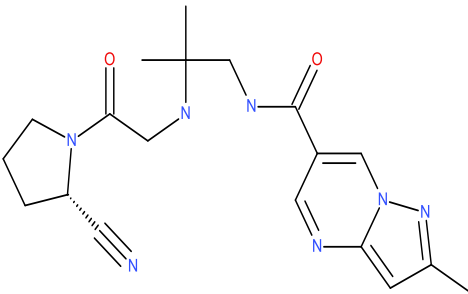
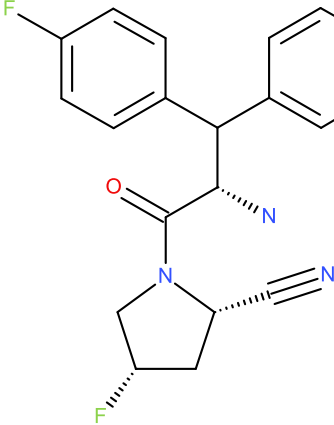
Структура и некоторые характеристики иДПП-4

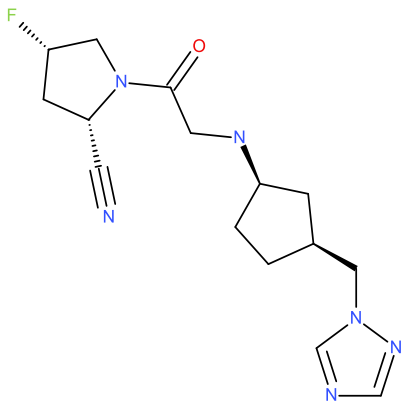
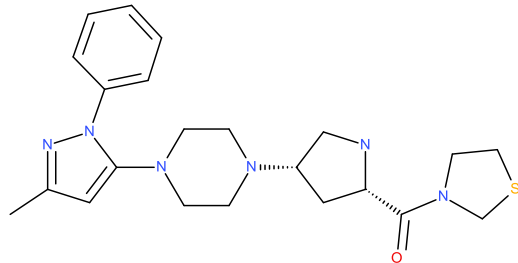
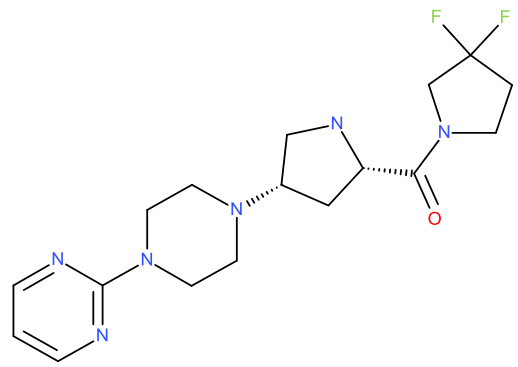
Препарат	Структурная формула	IC ₅₀ (нМ)	Биодоступность	Активность фермента (% ингибирования)	Селективность	T _{1/2}	↓HbA1c
Ситаглиптин		18		80% и 47% на второй и 24 час	ДПП-8 (48000 нМ), ДПП-9 (>100000 нМ)		
Ретаглиптин (SP-2086) Jiangsu Hengrui Medicine		8			ДПП-8 (в 3263 раз) и ДПП-9 (9438 раз)	1,5ч	

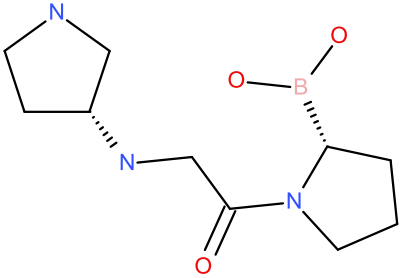
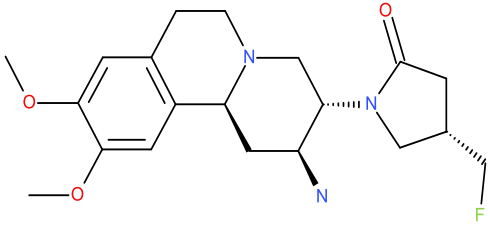
Эвоглиптин (DA-1229, Dong-A Pharmaceutical)		0,98	50,2%	80%	ДПП-8 и ДПП-9 в 6000 раз	30ч	на 0,56% в дозе 2,5мг и на 0,61% в дозе 5мг
Гемиглиптин (LC15-0444, LG Life Sciences)		6,3	63%	80%	ДПП-8 (более 27000 раз), ДПП-9 (более 23000 раз)		
Омариглиптин (MK-3102, Merck)		1,6	74%	77-89%		68ч	

Линаглиптин (BI-1356, Boehringer Ingelheim)		1,0	30%	≥80% в течение 24 часов	ДПП-8; ДПП- 9 (>10000)	113- 131 ч	
Алоглиптин (SYR-322, Takeda)		7	100%	90% в течение 24 ч			

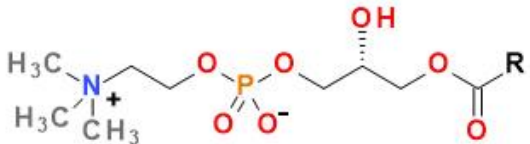
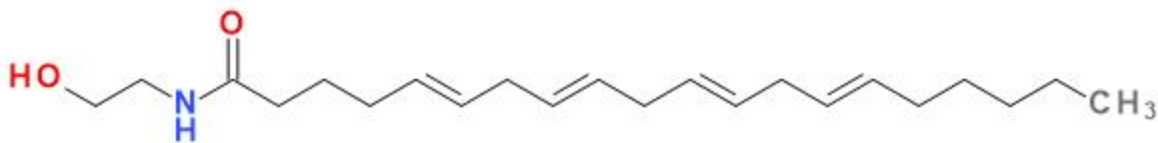
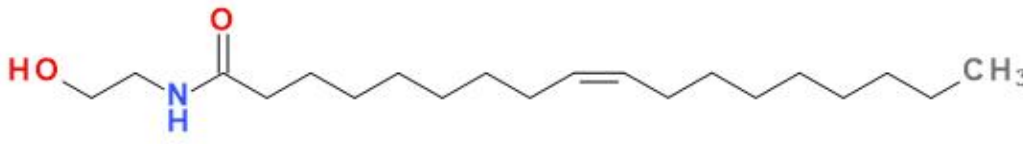
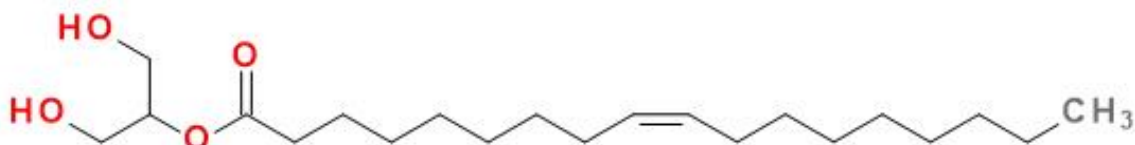
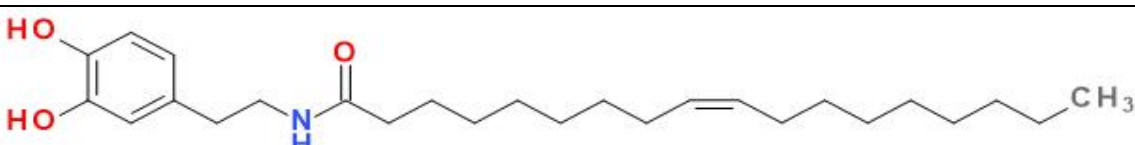
Трелаглиптин (SYR-472, Takeda/Furiex)		4,2	50,3%	на 70%		72-168 ч	
Вилдаглиптин (LAF-237)		3,5	85%	80% в течение 7ч и сохраняет 40% после 24ч	ДПП-8 (>250 раз) и ДПП-9 (23 раза)		в дозе 25мг/сут – 0,6%
Саксаглиптин (BMS-477118)		26	67%	80% и 57% до 90мин и 24ч	ДПП8 в 390 раз, ДПП 9 в 77 раз		в дозе 2,5-10мг ~ 1%

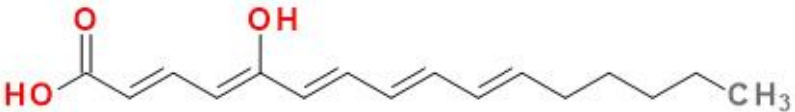
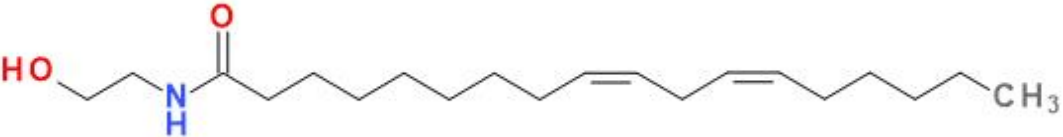
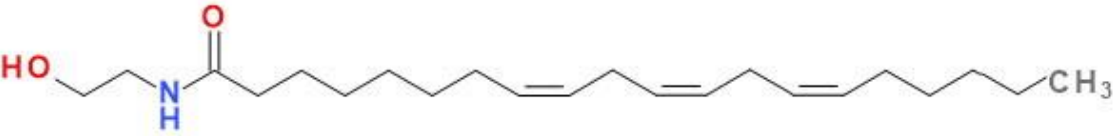
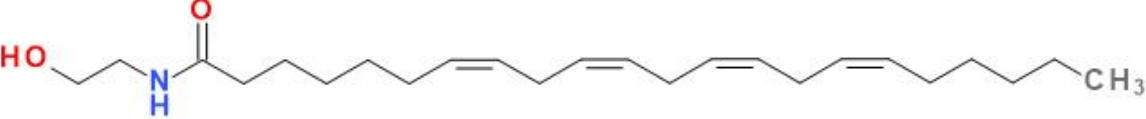
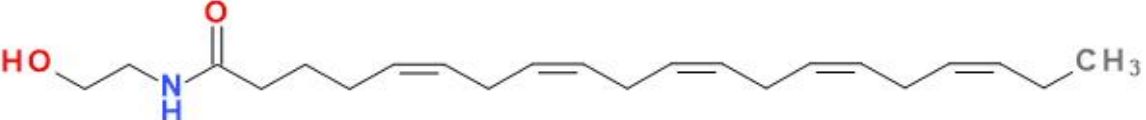
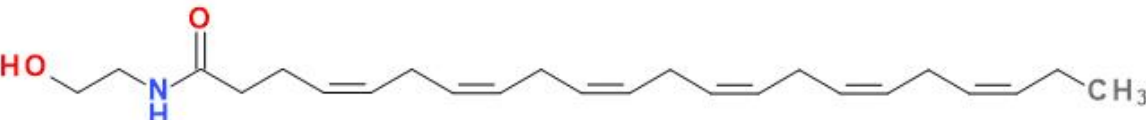
Анаглиптин (SK-0403, Sanwa Kagaku Kenkyusho)		3,8	73%	95% в дозе 3 мг/кг	ДПП-8 и ДПП-9 более чем в 10000 раз	в дозе 100мг на 0,5%
Денаглиптин (GSK-823093, GW823093C, GlaxoSmithKline)		22		максимальное через 30мин и более чем на 85% через 24 ч в дозе 25 мг	100 раз в отношении изоферментов	в дозе 45мг на 0,84%

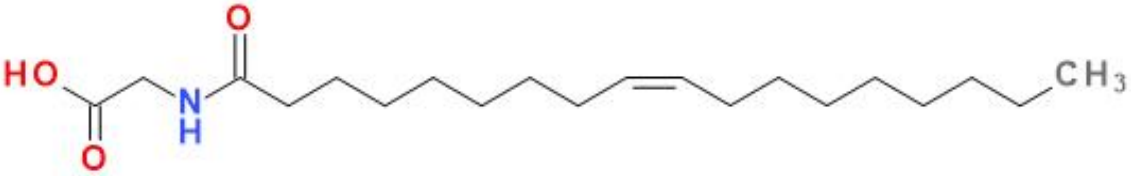
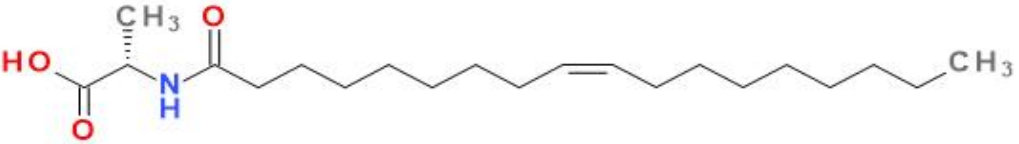
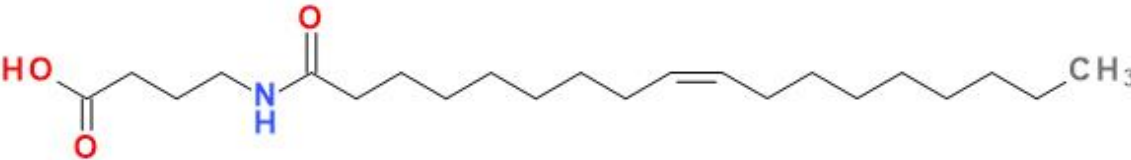
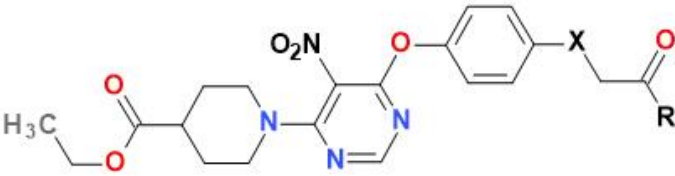
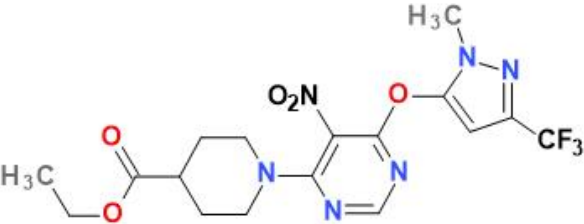
Мелоглиптин (GRC 8200, EMD-675992, GlenMark)		1,61	60, 90 и 94% у крыс, собак и обезьян соответственно	более чем 90% в течение 1 ч	более чем в 10000 раз		на 0,75% (50мг) и 0,60% (100мг/сут)
Тенелиглиптин (MP-0513, Mitsubishi Tanabe)		1,8	в дозе 0,1-1,0 мг/кг перорально – 63-85%	на 50% в течение 24ч	ДПП-8 (в 703 раза) и ДПП-9 (в 1460 раз)	8-16ч	
Госоглиптин (PF-00734200, Pfizer)		13	более 99%	на 75% через 24 часа	ДПП-2 и ДПП-8 (в 100 раз)	2,7ч	

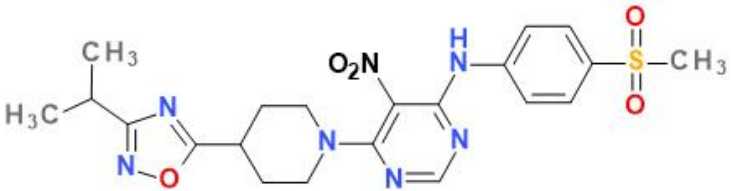
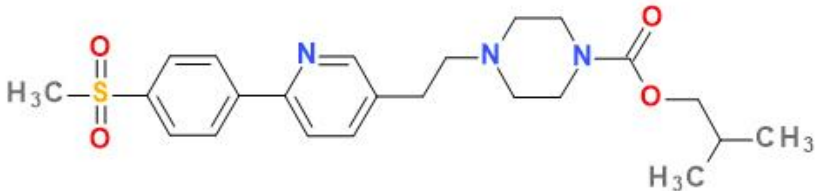
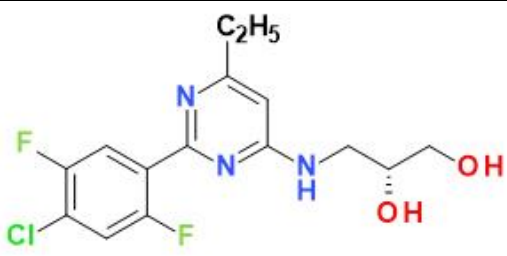
Дутаглиптин (PHX1149, Phenomix Corp)		25		в дозе 400мг 90%, в дозе 100мг - 50% ингибирование в течение 24 ч	в отличие от ДПП-8 и ДПП-9 (в 400 раз)	10-13ч	
Кармеглиптин (R-1579, F. Hoffmann- La Roche)		6,8	у обезьян в дозе 1 мг/кг составля ет 33%, у крыс 28%	на 40 и 60% через 24 и 48ч	ДПП-8 и ДПП-9 (более чем в 100 раз) и ДПП-2 (более чем в 2000 раз)	6,8ч	

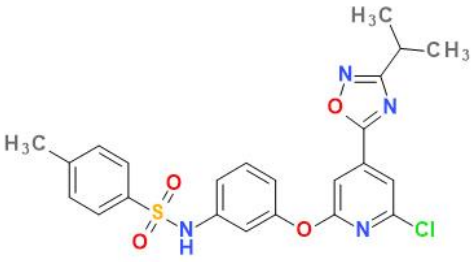
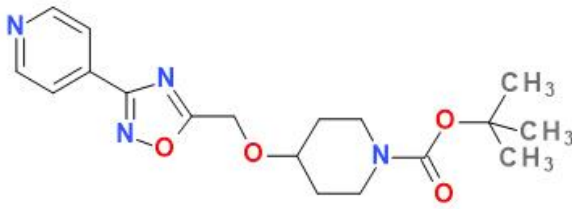
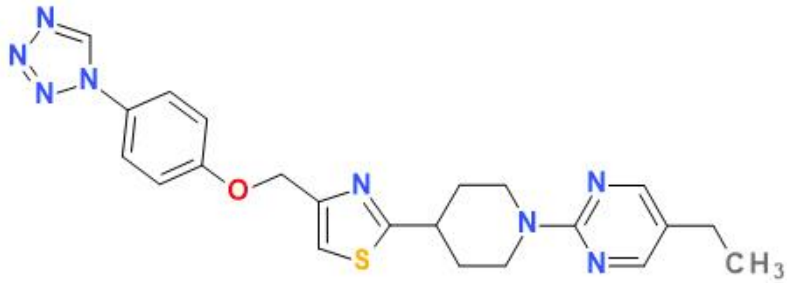
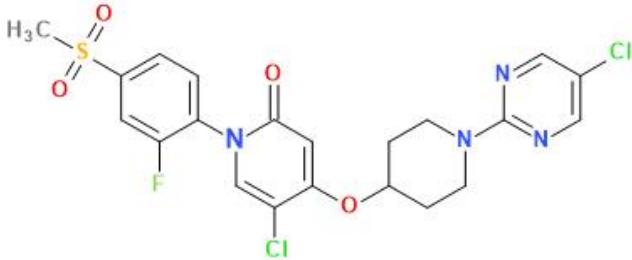
Структура и некоторые характеристики агонистов GPR119

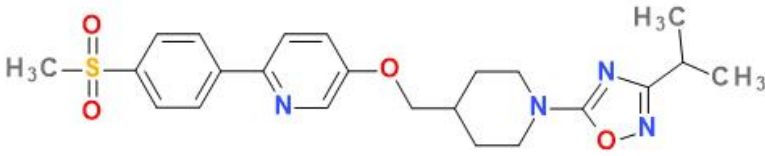
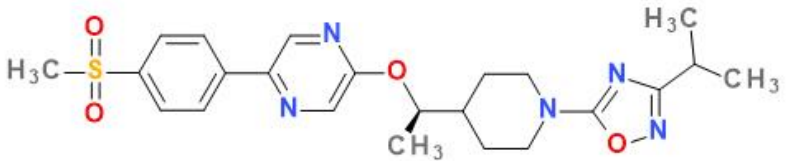
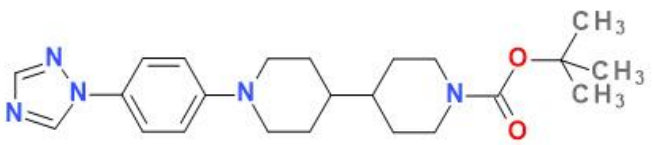
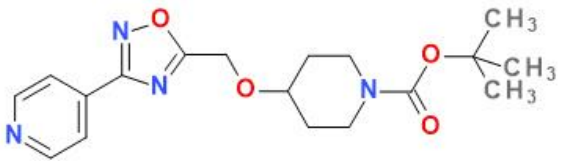
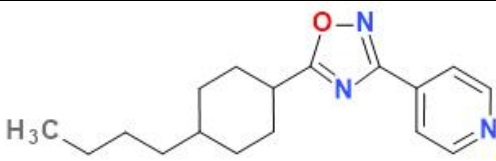
Название	Структура	Активность
Природные		
лизофосфатидилхолин (LPC)		-
Анандамид, N-арахидоноилэтаноламид (AEA)		-
олеоилэтаноламин (OEA)		-
2-олеоилглицерол (2OG)		-
N-олеоилдофамин (OLDA)		-

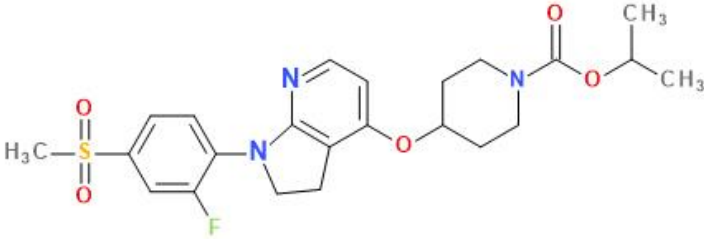
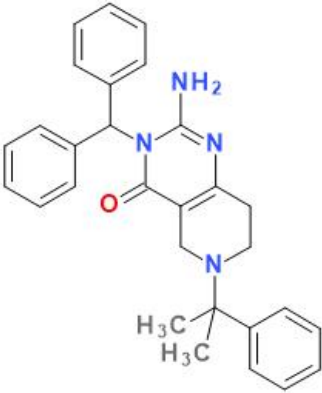
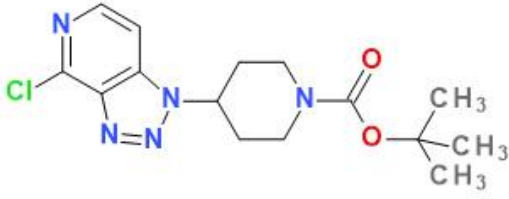
5-гидроксиэйкозапентаеновая кислота (5-НЕРЕ)		-
Линолеоилэтаноламид (ЛЕА)		-
Дигомо-γ-линоленоилэтаноламид (ДЛЕА)		-
Докозатетра-7Z,10Z,13Z,16Z-еноилэтаноламид (ДТЕА)		-
Эйкозапентаеноилэтаноламид (ЕПЕА)		-
Докозагексаеноилэтаноламид (ДГЕА)		-

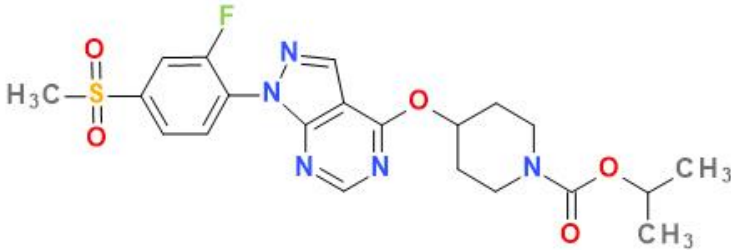
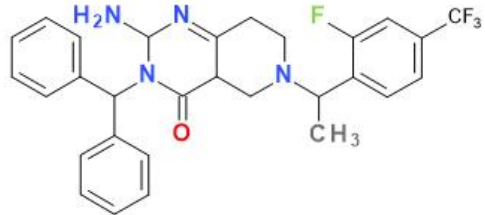
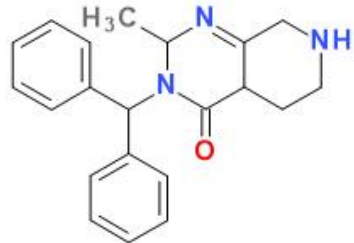
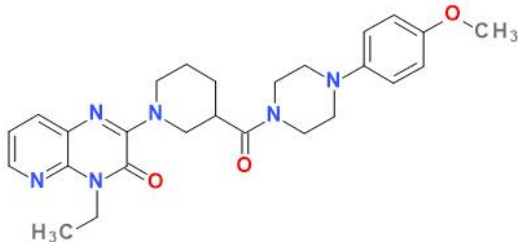
N-Олеилглицин		-
N-Олеилаланин		-
N-Олеил-γ-аминомасляная кислота		-
Синтетические		
		EC ₅₀ менее 10 мкМ
		EC ₅₀ менее 1 мкМ

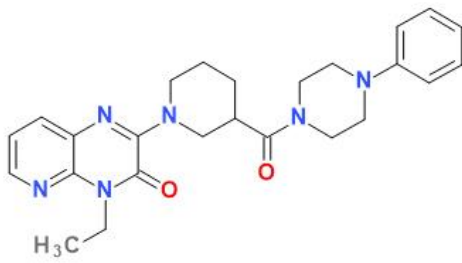
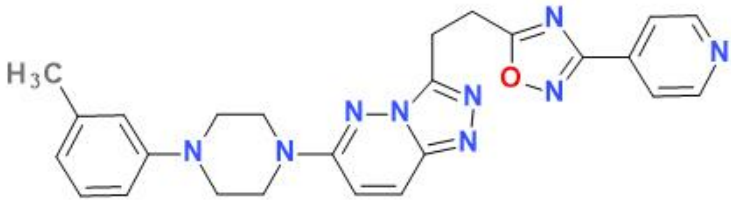
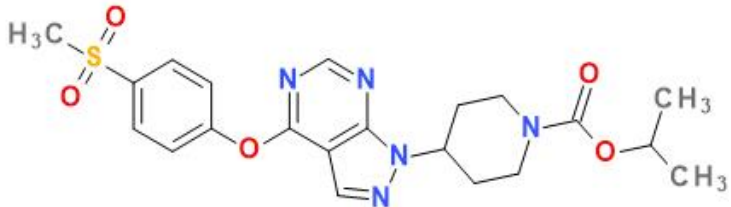
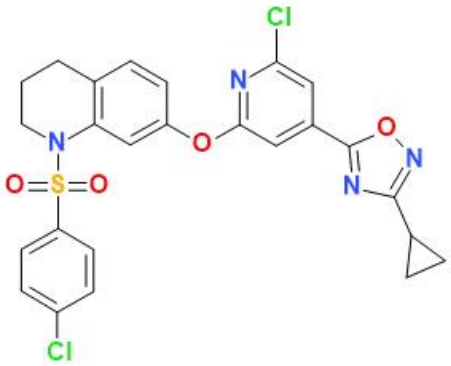
		EC_{50} менее 1 мкМ
		EC_{50} менее 1 мкМ
		EC_{50} = 0.022 мкМ
		EC_{50} = 0.28 мкМ

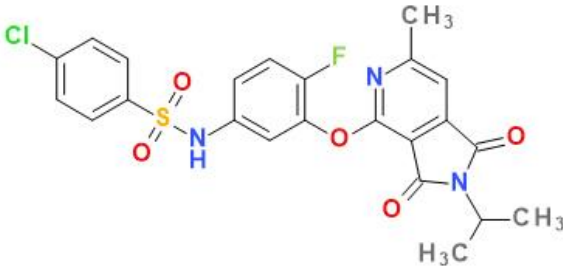
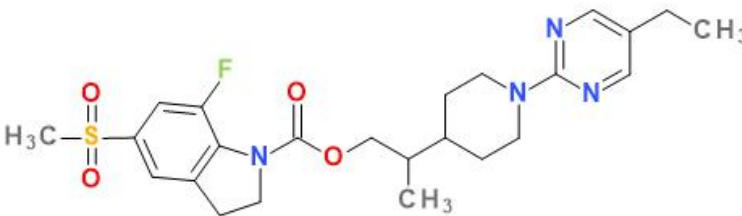
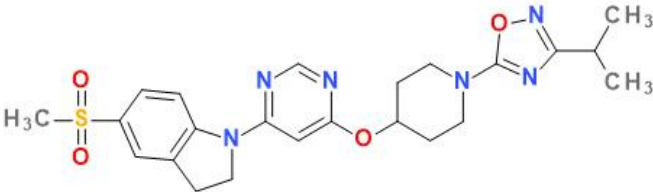
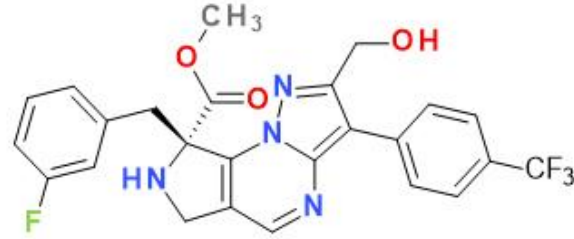
		$EC_{50} = 0,024$ мкМ
		$EC_{50} = 5.6$ мкМ
MBX-2982		$EC_{50} = 10$ мкМ
BMS-903452		$EC_{50} = 14$ нМ

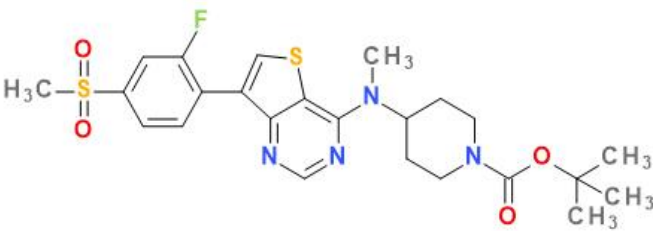
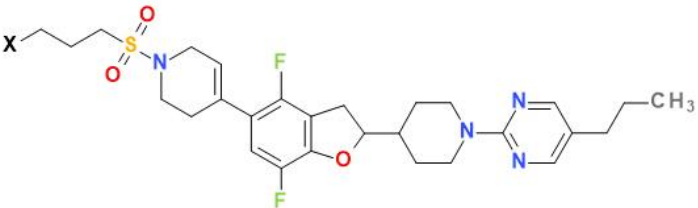
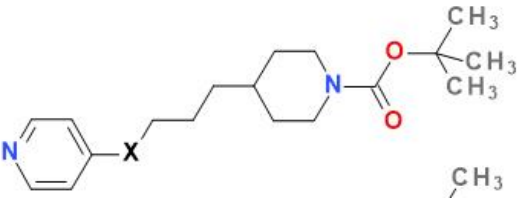
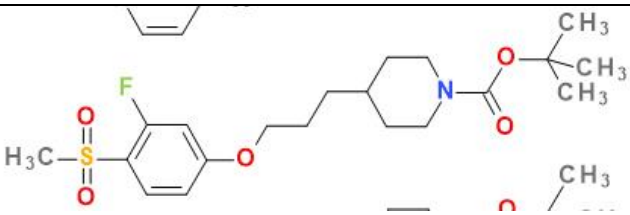
GSK1292263		$EC_{50} = 6.9$ нМ
GSK2041706A		$EC_{50} = 4$ нМ
		$EC_{50} < 10$ нМ
PSN632408		$EC_{50} = 5.6$ мкМ
PSN375963		$EC_{50} = 8.4$ мкМ

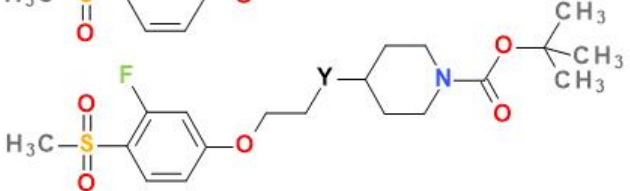
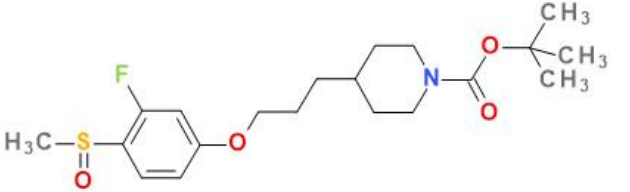
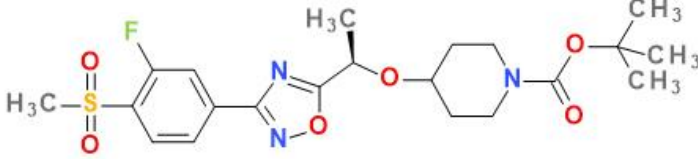
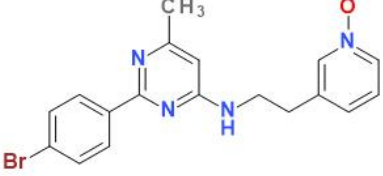
GSK252A		$EC_{50} = 40$ nM
		$EC_{50} = 50 -$ $14000 nM$
		$EC_{50} = 2.78$ μM

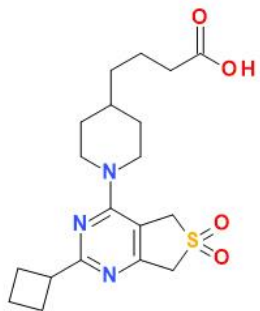
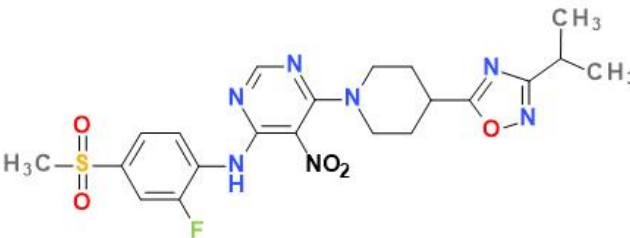
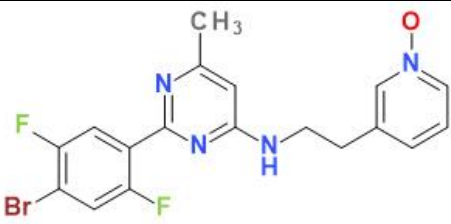
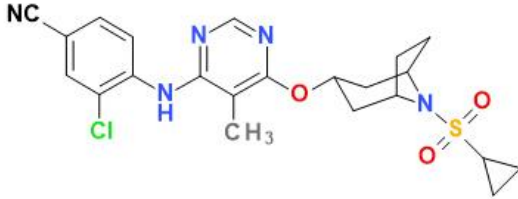
APD668		EC ₅₀ = 2.51 мкМ
		EC ₅₀ в диапазоне от 50 мкМ до 14000 мкМ
		EC ₅₀ в диапазоне от 50 мкМ до 14000 мкМ
ZSY-04		EC ₅₀ до 100 мМ

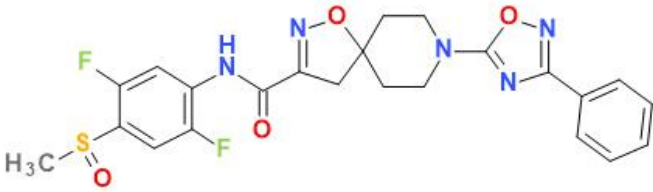
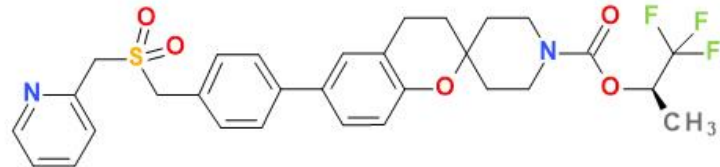
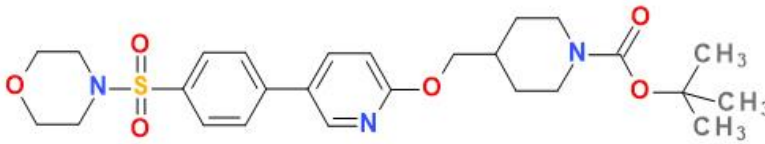
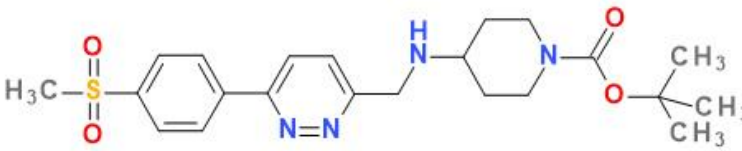
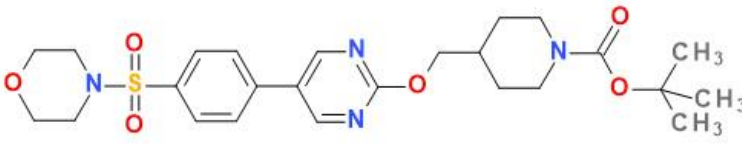
ZSY-06		EC ₅₀ до 100 мМ
ZSY-13		EC ₅₀ до 100 мМ
		EC ₅₀ = 0.15 мкМ
		EC ₅₀ = 0.05 мкМ

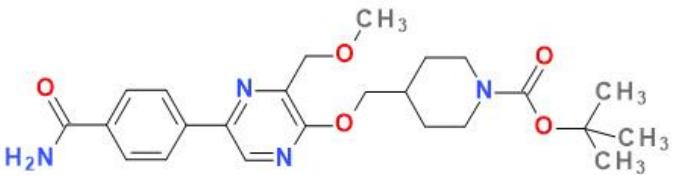
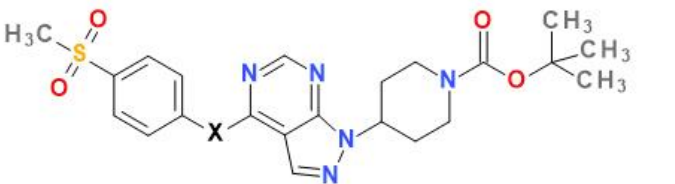
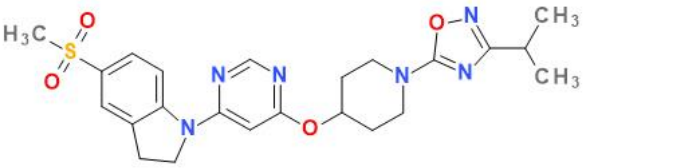
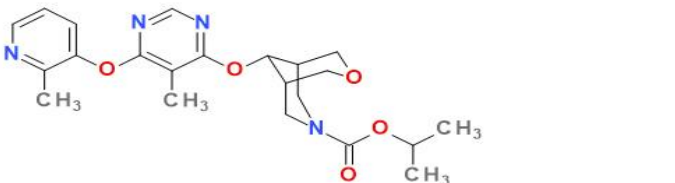
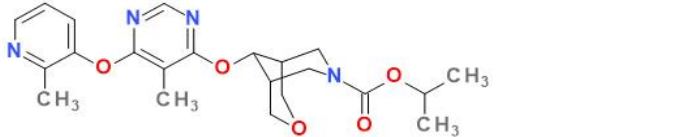
		$EC_{50} = 16$ нМ
		$EC_{50} = 3.9$ нМ
		$EC_{50} = 7.7$ нМ
		$EC_{50} = 5$ нМ

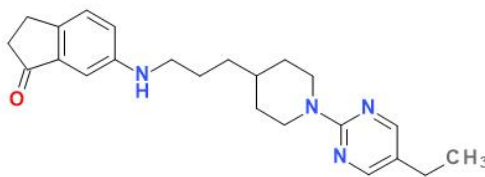
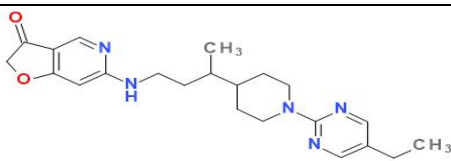
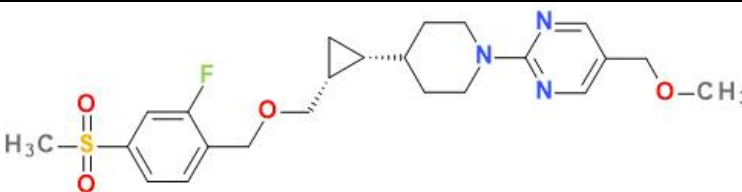
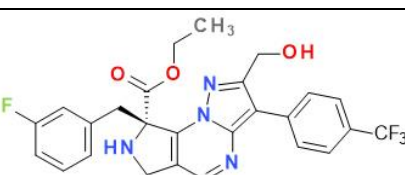
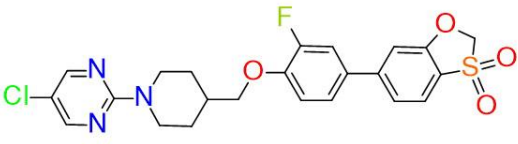
		$EC_{50} = 3 \text{ нМ}$
		(при $X = \text{H}$ $EC_{50} = 2$ нМ , при X $= \text{OH}$ $EC_{50} =$ 16 нМ)
		$EC_{50} = 0.5$ мкМ
		$EC_{50} = 0.5$ мкМ

		$EC_{50} = 0.5$ μM
PSN119-1		$EC_{50} = 0.4$ μM
PSN119-2		$EC_{50} = 0.4$ μM
AS1535907		$EC_{50} = 1.5$ μM
AS1269574		$EC_{50} = 2,5$ μM

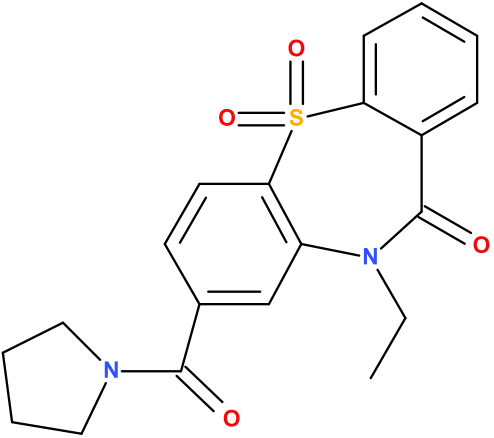
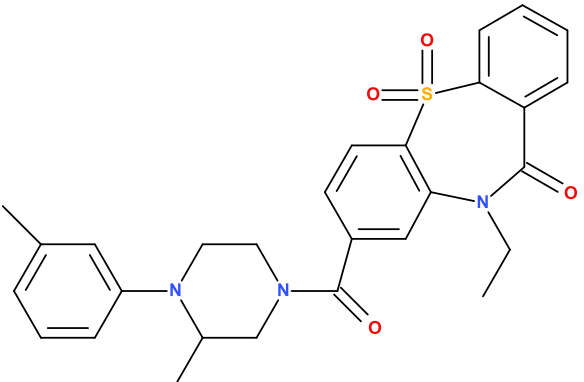
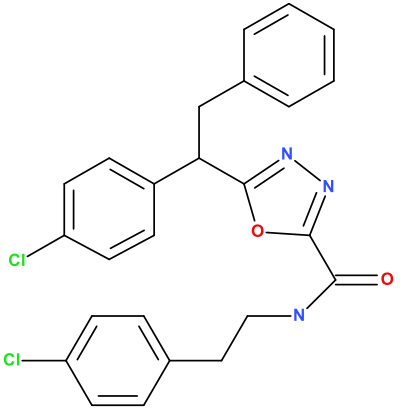
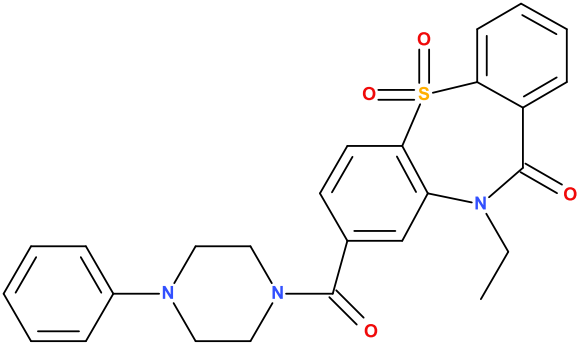
AS1907417		$EC_{50} = 2,5$ мкМ
AR231453		$EC_{50} = 0.68$ нМ
AS1669058		$EC_{50} =$ 0.044 мкМ
		$EC_{50} = 3$ нМ

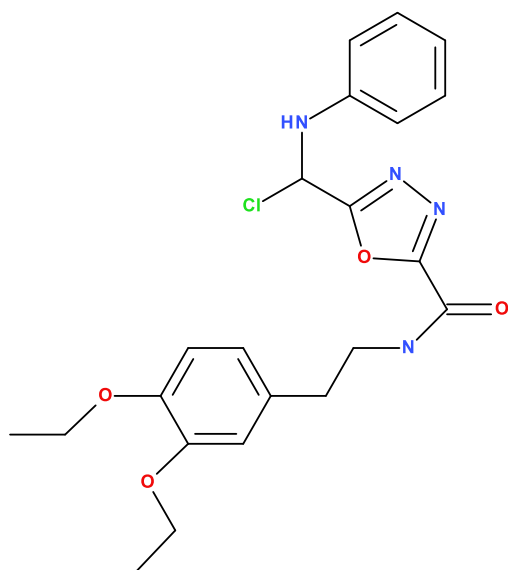
		$EC_{50} = 7 \text{ нМ}$
		$EC_{50} = 21 \text{ нМ}$
		$EC_{50} = 54 \text{ нМ}$
		$EC_{50} = 22 \text{ мкМ}$
		$EC_{50} = 46 \text{ мкМ}$
		$EC_{50} = 46 \text{ мкМ}$

		$EC_{50} = 14$ мкМ
		Если X = O $EC_{50} = 150$ нМ Если X = NH $EC_{50} = 5740$ нМ
		$EC_{50} = 7,7$ нМ
		$EC_{50} = 65$ нМ
		$EC_{50} = 25$ нМ

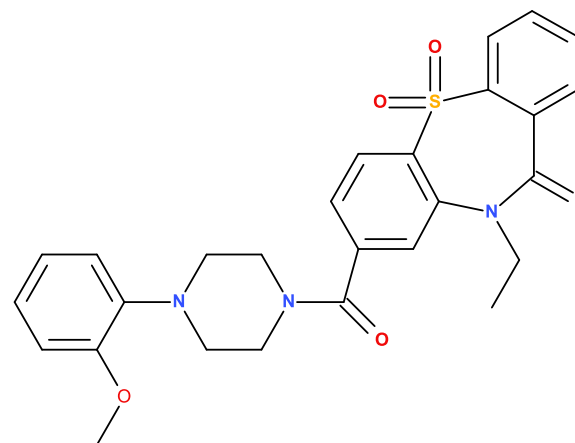
		$EC_{50} = 3 \text{ нМ}$
		$EC_{50} = 51 \text{ нМ}$
		$EC_{50} = 14 \text{ нМ}$
		$EC_{50} = 2,1 \text{ нМ}$
		$EC_{50} = 5 \text{ нМ}$
ZB-16		$EC_{50} = 7.25 \text{ нМ}$

Структура соединений, отклоненных на этапе планирования работы

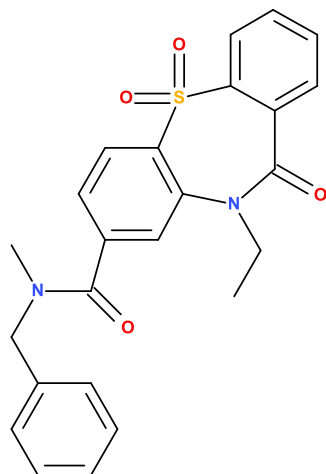
ID/Структура	ID/Структура
 C30-0277	 C530-0283
 C301-5916	 C530-0276



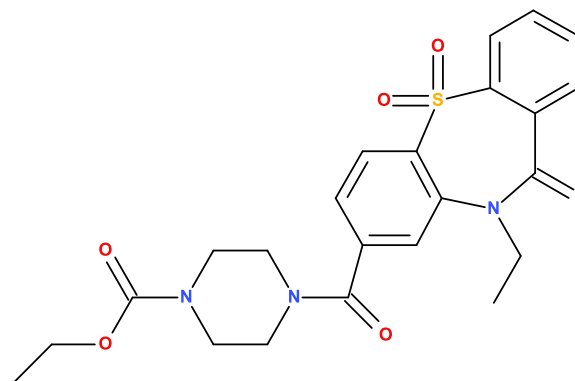
C301-5918



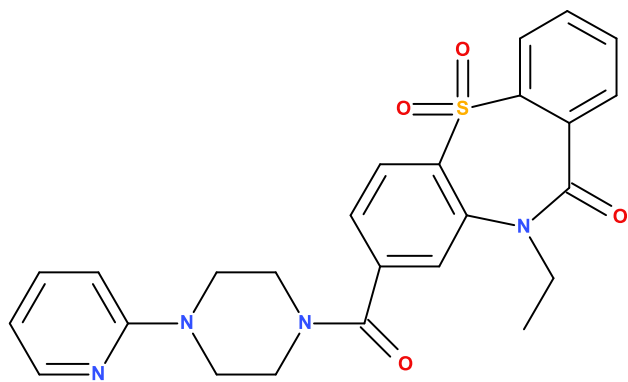
C530-0271



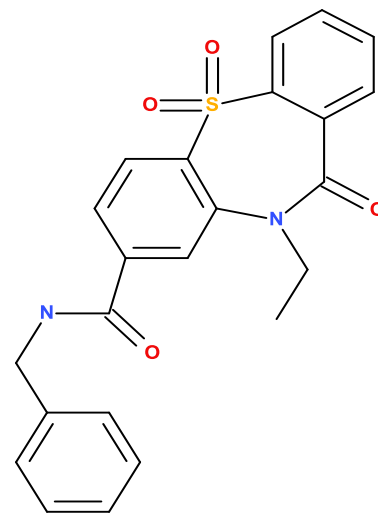
C530-0265



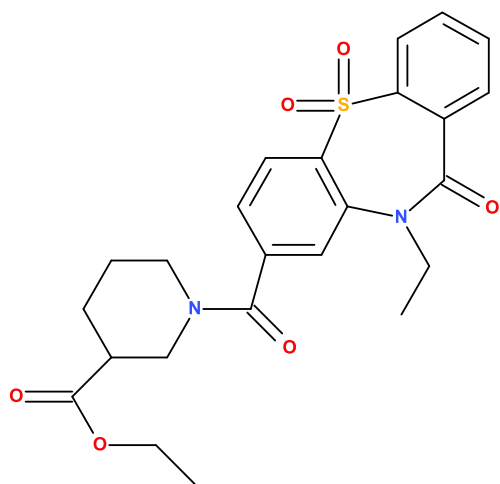
C530-0267



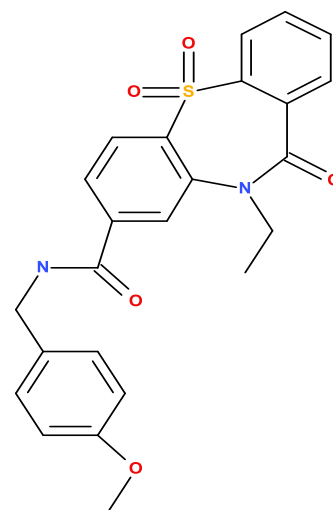
C530-0292



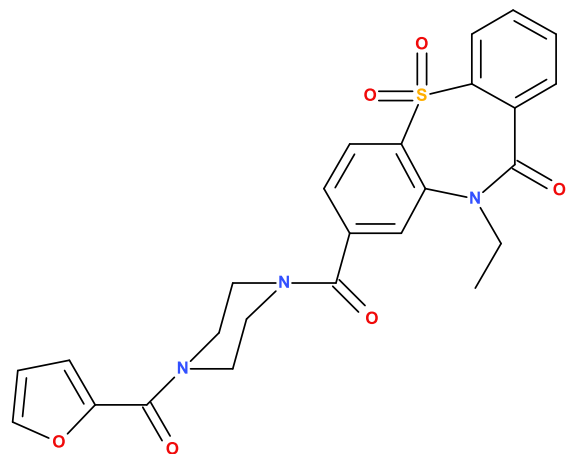
C530-0310



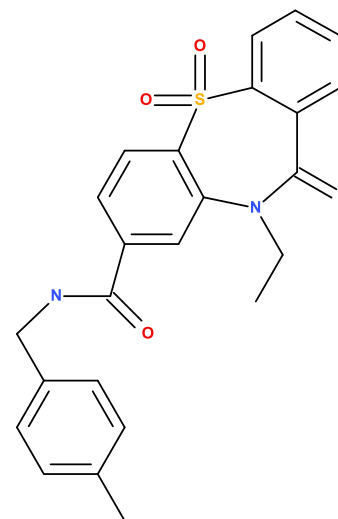
C530-0297



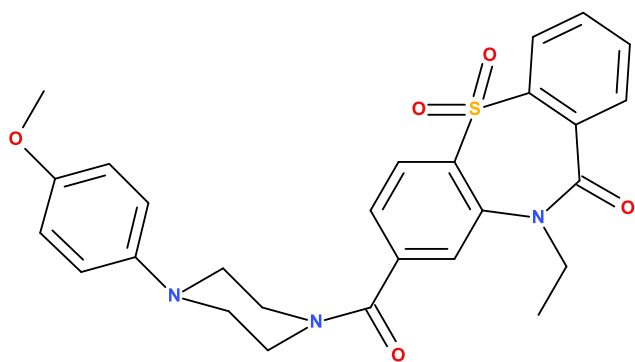
C530-0323



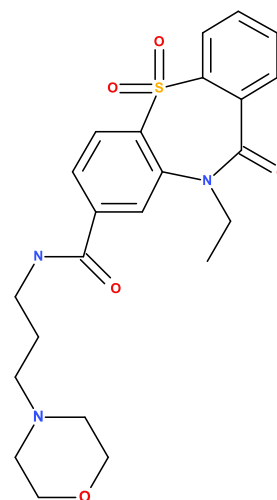
C530-0298



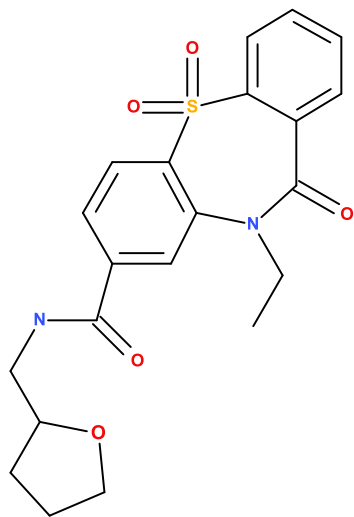
C530-0324



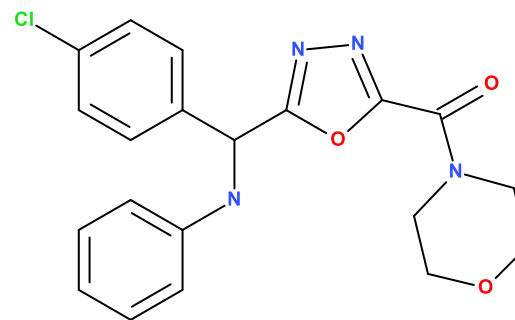
C530-0300



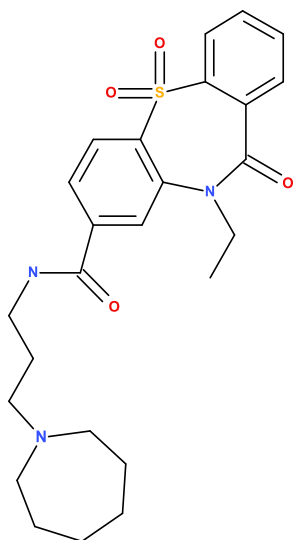
C530-0331



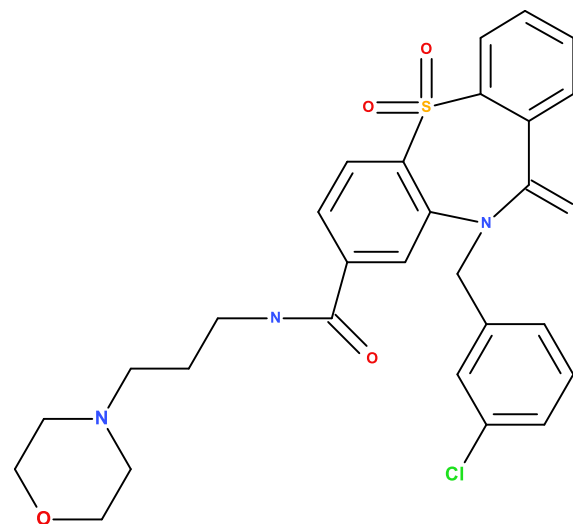
C530-0334



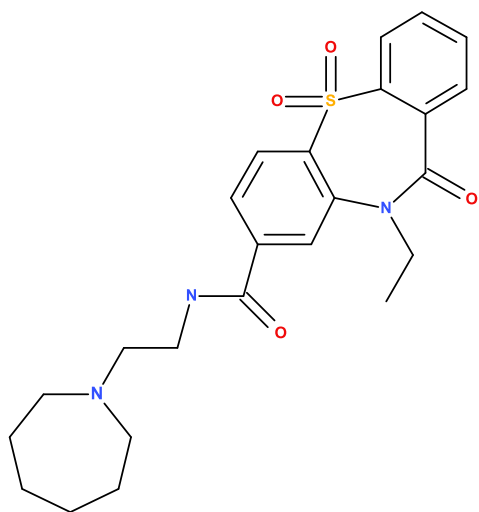
K788-8629



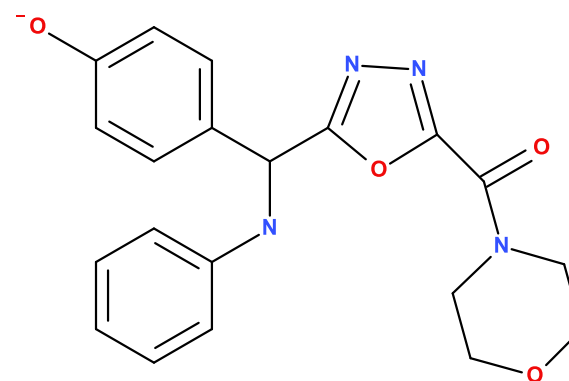
C530-0366



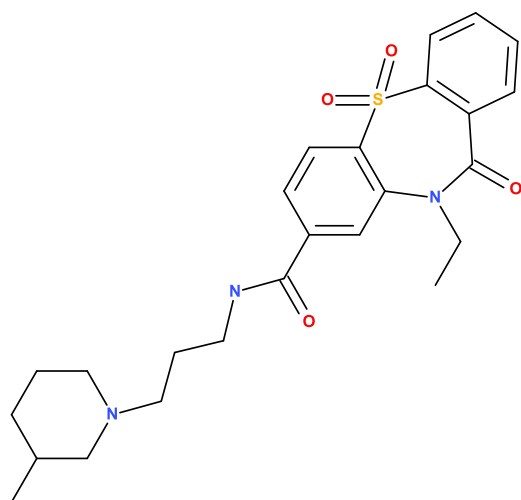
K788-9236



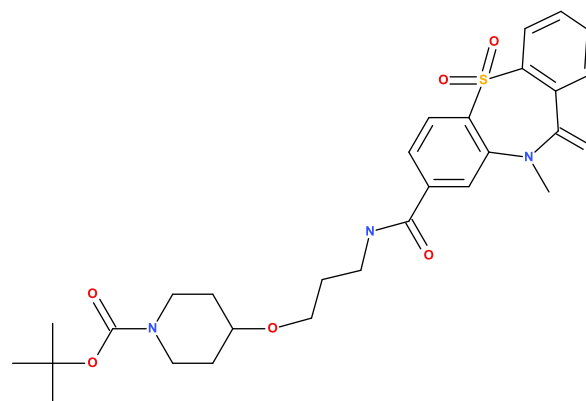
C530-0369



ZB40-0004

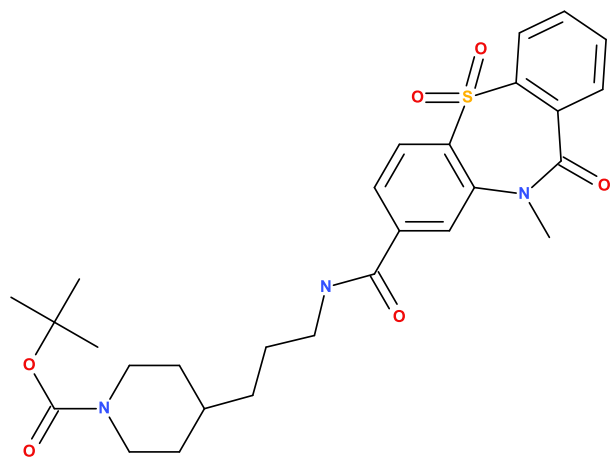


C530-0379

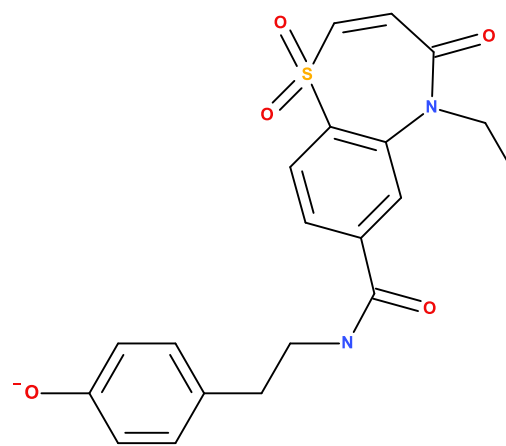


0006

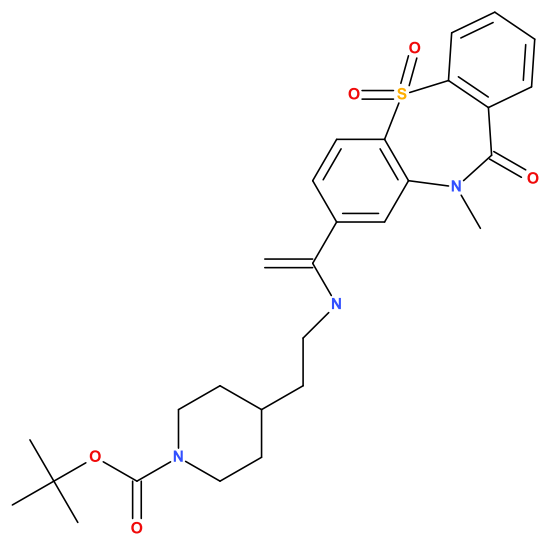
ZB40-



ZB40-0007

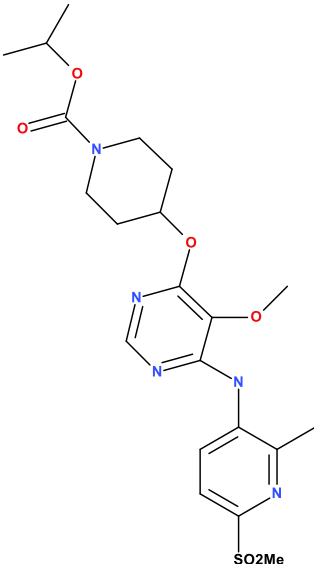


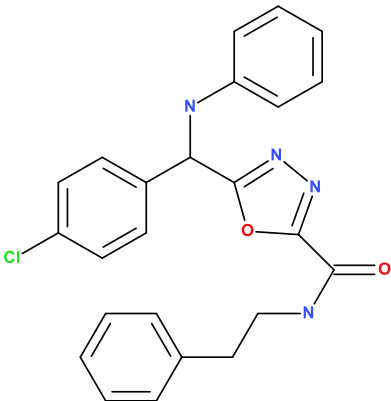
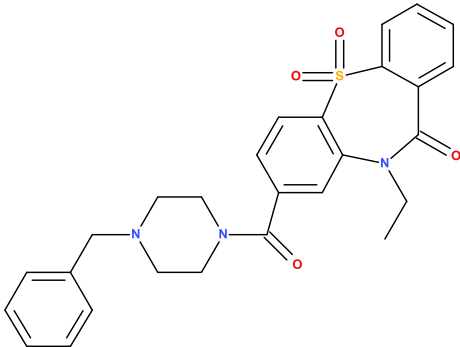
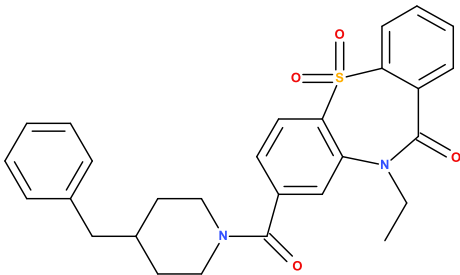
ZB40-0011

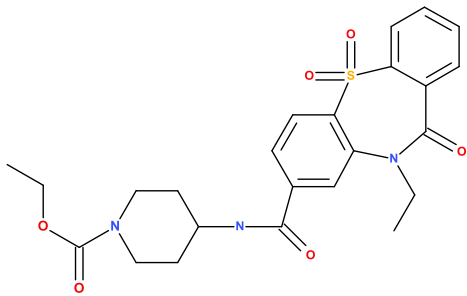
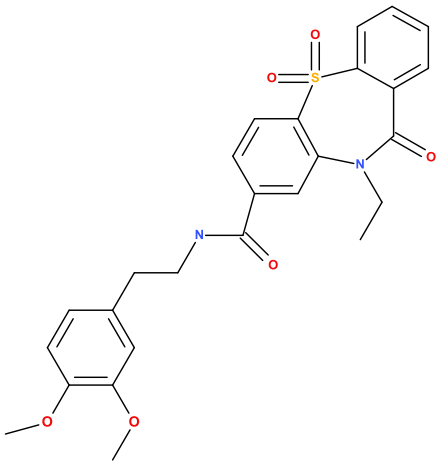


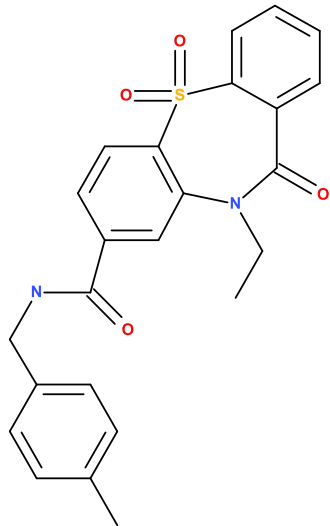
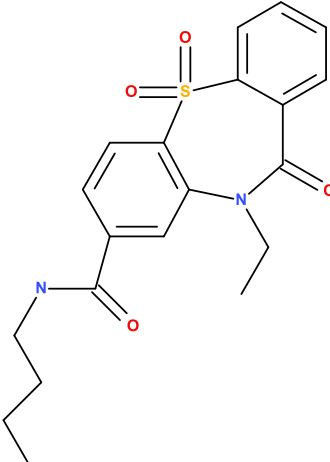
ZB40-0008

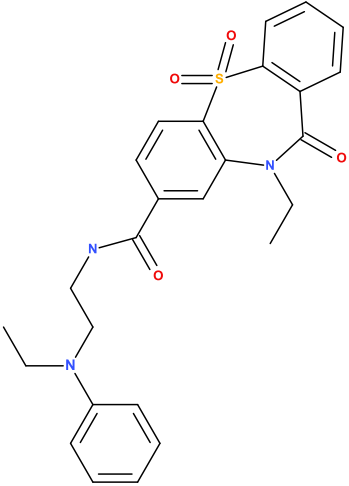
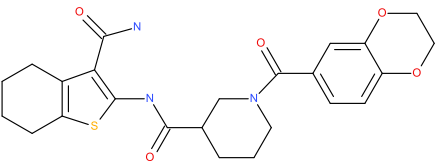
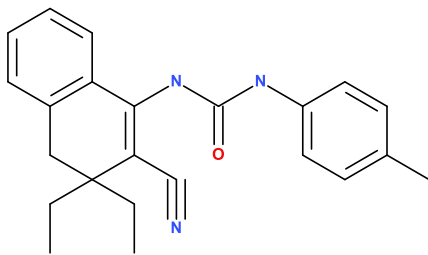
Структура соединений, отклоненных из-за не достаточно высокой активности или прогнозируемых неудовлетворительных фармакокинетических параметров

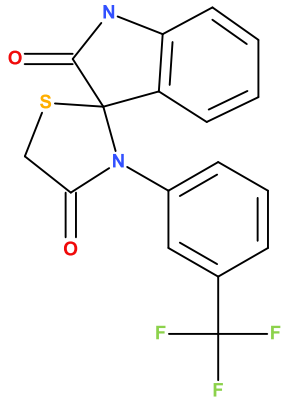
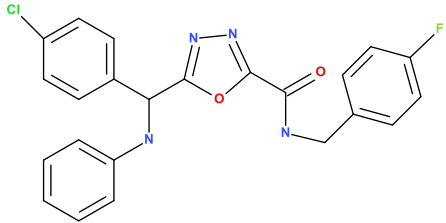
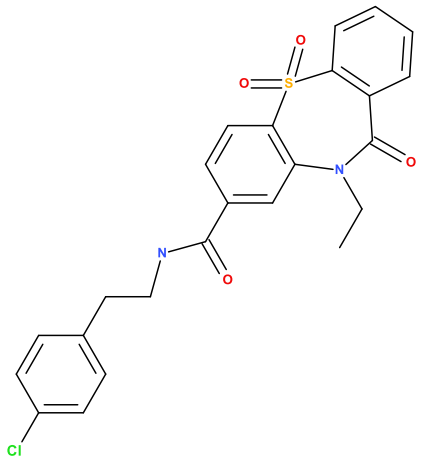
ID	Структура	Максимальная протестированная концентрация, нМ	EC ₅₀ , М
Arena (0119)	 <chem>CC1=CC=C(C=C1N)N2C=CC(=C2)Oc3ccccc3N(CCC(C)C)C(=O)OC</chem>	10	9,01 нМ

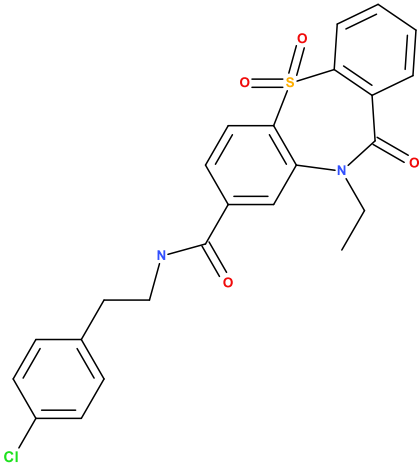
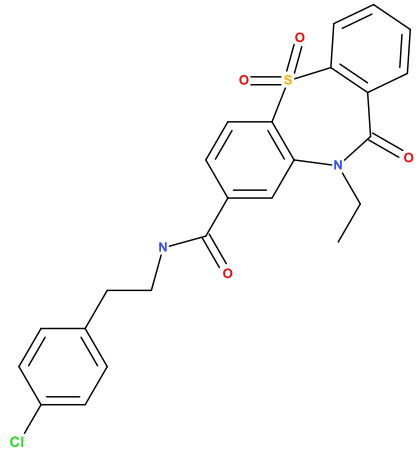
C301-5917		30	2,74 мкМ
C530-0289		30	11,7 мкМ
C530-0291		30	2,42 мкМ

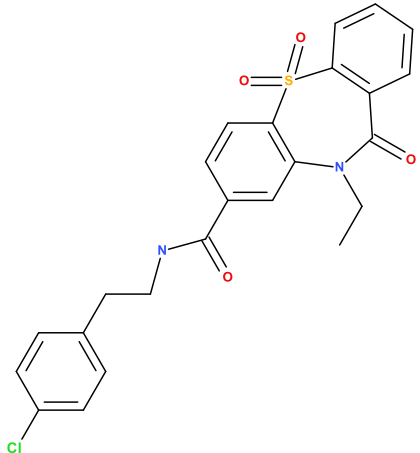
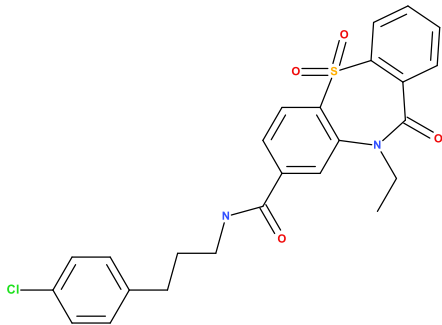
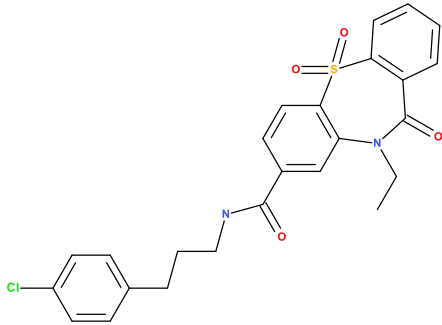
C530-0306	 Chemical structure of C530-0306: A complex molecule featuring a central benzene ring. One side of the ring is connected to a sulfonamide group (SO₂Ph) and an amide group (N-Et). The other side is connected to a carbonyl group (C=O) which is linked via a nitrogen atom to a cyclohexane ring. The cyclohexane ring is further connected to an amide group (C=O) which is linked to an ethyl ester group (OEt).	30	19,4 мкМ
C530-0320	 Chemical structure of C530-0320: A complex molecule featuring a central benzene ring. One side of the ring is connected to a sulfonamide group (SO₂Ph) and an amide group (N-Et). The other side is connected to a carbonyl group (C=O) which is linked via a nitrogen atom to a propyl chain. The propyl chain is further connected to a benzene ring with two methoxy groups (OMe).	30	2,20 мкМ

C530-0339	 <chem>CCN(C(=O)c1ccccc1)C2=CC=C(C(=O)NCCc3ccc(C)cc3)C2=CC=C(S(=O)(=O)c3ccccc3)C2=O</chem>	30	10,7 мкМ
C530-0358	 <chem>CCN(C(=O)c1ccccc1)C2=CC=C(C(=O)NCCC)C2=CC=C(S(=O)(=O)c3ccccc3)C2=O</chem>	30	31,0 мкМ

C530-0389		30	3,30 мкМ
D216-0545		30	2,75 мкМ
D469-0068		30	0,431 мкМ

K205-1693		30	0,537 мкМ
C301-5947A		30	0,587 мкМ
C530-0315		30	71,3 нМ

C530-0335	 <chem>CCN1C(=O)c2ccccc2S1(=O)c3ccc(cc3C(=O)NCCCc4ccc(Cl)cc4)S(=O)(=O)c5ccccc5</chem>	30	0,603 μM
C530-0386	 <chem>CCN1C(=O)c2ccccc2S1(=O)c3ccc(cc3C(=O)NCCCc4ccc(Cl)cc4)S(=O)(=O)c5ccccc5</chem>	30	0,758 μM

ZB40-0010	 <chem>CCN1C(=O)c2ccccc2S1(=O)=Oc3ccc(cc3C(=O)NCCCCc4ccc(Cl)cc4)C1=O</chem>	30	0,422 мкМ
ZB40-0012	 <chem>CCN1C(=O)c2ccccc2S1(=O)=Oc3ccc(cc3C(=O)NCCCCc4ccc(Cl)cc4)C1=O</chem>	30	4,05 мкМ
ZB40-0014	 <chem>CCN1C(=O)c2ccccc2S1(=O)=Oc3ccc(cc3C(=O)NCCCCc4ccc(Cl)cc4)C1=O</chem>	30	0,449 мкМ

Приложение 5

Гипогликемическая активность соединения ZB-16 при 4-х недельном пероральном введении животным с ЭСД в дозах 0,1 и 1 мг/кг в сравнении с препаратом ситаглиптин

	-3 сут	ПТТГ 0 сут					7 сут	ПТТГ 14 сут					21 сут	ПТТГ 28 сут				
		Время, мин				AUC		Время, мин				AUC		Время, мин				AUC
		0	30	60	120			0	30	60	120			0	30	60	120	
Интакт	4,0	4,1	5,5	5,7	3,8	595,3	4,4	4,2	5,8	5,8	4,3	628	4,1	3,7	5	4,9	3,8	537,3
	0,1	0,1	0,3	0,4	0,2	25,6	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	30,4	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	19,8
%		2,9*	32,4#	38,5#	-8,1#		9,6*	5,8*	36,2#	37,8#	1,6#		2,5*	-7,5*	34,2#	31,1#	3,2#	
ЭСД	4,2	13,6	18,8	23,6	15,5	2292,5	12,3	11,7	25,4	22,4	15,9	2422	11,3	10,8	21,6	16,5	11,0	1862,5
	0,21	1,04	1,12	1,55	0,9	108,53	0,53	0,61	1,18	0,94	0,65	93,22	0,7	0,7	1,06	0,25	0,63	40,37
%		223*	38,3#	74#	14#	285,1	192,1*	179*	117,1#	91#	35,4#	285,7	167,9*	157,1*	124,4#	70,9#	13,7#	246,7
%							-9,6^	-13,6^					-17,1^	-20,4^				
ZB-16 0,1 мг/кг	3,9	13,1	19,2	25,2	15,5	2371,1	10,8	10,5	21	17	12,4	1924,3	9,0	8,4	17,6	13,2	9,4	1532,6
	0,21	0,85	0,70	1,27	0,83	99,01	0,66	0,59	1,12	0,73	0,75	72,36	0,45	0,46	0,82	1,13	0,55	54,84
%		236,6*	45,9#	92,2#	17,8#	3,4	176,2*	168,1*	101,0#	62,3#	19,0#	-20,5	130,4*	116,1*	108,8#	56,9#	11,9#	-20,7
%							-18,0^	-20,3^					-31,6^	-35,8^				-35,4&
ZB-16 1 мг/кг	3,5	12,4	19,6	23,7	14,8	2287,9	10,4	10,4	20,9	17,5	10,9	1899	8,4	7,9	15,7	13,1	8,2	1424,8
	0,15	0,56	0,74	1,62	0,89	115,01	0,86	0,48	1,44	0,87	0,67	73,28	0,49	0,42	0,88	0,76	0,14	54,97
%		257*	57,7#	90,6#	19,3#	-0,2	199,6*	19,2*	100,4#	68,2#	4,2#	-21,6	140,6*	126,2*	99,1#	65,8#	4,5#	-26,3
%							-16,1	-16,2					-32,6	-36,6				-37,7&
Сита- глиптин	4,1	12,8	19,7	25,1	15,3	2375,6	10,1	9,2	19,6	16,6	10	1776	8,1	7,5	13,8	11,5	7,9	1282,1
	0,23	0,61	0,6	1,16	0,64	79,56	0,59	0,53	0,80	0,58	0,60	61,63	0,41	0,49	0,51	0,39	0,44	45,53
%		214,3*	53,7#	95,7#	19,4#	3,6	147,6*	125,2*	113,4#	80,7#	9#	-26,7	97,9*	82,9*	84,5#	54,1#	6,3#	-33,6
%							-21,2^	-28,4^					-37^	-41,8^				-46&

Примечания. * % изменения концентрации глюкозы от значений зафиксированных до ЭСД; # % изменения концентрации глюкозы от значений зафиксированных до ПТТГ; ^ % изменения концентрации глюкозы от значений зафиксированных до начала лечения; % AUC – отличия от значений группы ЭСД; % & AUC – отличия от значений до начала лечения

Гипогликемическая активность соединения ZB-16 и его комбинаций с метформином и ситаглиптином при 4-х недельном пероральном введении животным с ЭСД

	-3 сут	0 сут	7 сут	ПТТГ 14 сут					21 сут	ПТТГ 28 сут				
				Время, мин				AUC		Время, мин				AUC
				0	30	60	120			0	30	60	120	
Интакт	4,2	4,5	4,5	4,5	5,3	6	4,6	636,2	4,6	5	5,6	6,1	4,9	662,1
	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	7,8	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	13
%		8*	0,0*	-0,6	17,7#	33#	2,8#		10,1	7,3	20,5#	22,4#	-1,3#	
ЭСД	4,0	14,8	14,6	14,3	26,1	30,7	20,7	2997	14,1	13,6	24,6	27,6	19,4	2764
	0,1	0,5	0,6	0,6	1,3	0,9	1,1	103,2	0,6	0,6	1,6	1,4	1,2	144,9
%		273,6*	267,3*	259,3*	82,9#	114,8#	44,7#	371,1	254,9*	241*	74,5#	103,6#	43#	317,5
%			-1,7^	-3,8^					-5,0^	-8,7^				-7,8&
ZB-16	4,2	13,3	12,3	12	19,5	22,7	14,7	2227,5	10,7	9,9	16,8	18	12,3	1831,9
	0,1	0,6	0,8	0,9	1,3	1,9	1,1	164,7	0,8	0,7	1,1	1,6	0,9	138,7
%		216,2*	194,2*	186,4*	62,5#	88,8#	22,4#	-25,7	154,8*	135,5*	57,2#	82,2#	24,9#	-33,7
%			-6,9^	-9,4^					-19,4^	-25,5^				-17,8&
Метформин	4,1	13,4	12,4	11,7	17	20,9	13,6	2038	10,8	9,7	15,1	16,9	11,6	1706,7
	0,1	0,6	0,7	0,8	1,2	1,7	1	151,2	0,9	0,9	1,3	1,5	1	146,1
%		227,4*	203,6*	171,3*	45,6#	79#	16,6#	-32	164,6*	138,3*	39,2#	73,7#	19,4#	-38,3
%			-7,3^	-12,5^					-19,2^	-27,2^				-16,3&
ZB-16+ Метформин	4,0	13,5	12,2	10,9	15,5	17,5	12,2	1784,5	10,2	9,2	13,2	14,7	10,2	1502,4
	0,1	0,5	0,7	0,7	1	1,2	0,8	113,4	0,6	0,6	0,9	1,1	0,7	100,2
%		236,3*	202,4*	171,3*	41,8#	60,4#	12,1#	-40,5	152,1*	127,9*	30,1#	60,2#	11,5#	-45,6
%			-10,1^	-19,3^					-25^	-32,2^				-15,8&
Ситаглиптин	3,9	13,4	12,6	11,8	19	23,3	15,1	2246,5	10,9	10,7	16,5	19,2	13,1	1915,8
	0,1	0,5	0,6	0,6	1,1	1,5	0,8	130,9	0,7	0,8	1	1,3	0,8	125,3
%		248,2*	227*	-6,3	60,6#	97,2#	27,4#	-25	183,2*	176,5*	51,4#	80,4#	23,1#	-30,7
%			-6,1^	-12^					-18,7^	-20,6^				-14,7&
ZB-16+ Ситаглиптин	4,2	13,5	12,2	11,3	17,7	20,8	14,7	2075,2	10,3	9,5	15,6	17,8	12,5	1785,5
	0,1	0,5	0,5	0,5	0,9	1,2	0,7	103,4	0,6	0,5	0,9	1	0,7	97,2
%		224,5*	194,5*	173,2*	55,8#	83,2#	29,5#	-30,8	149*	129,*	50,9#	86,8#	31#	-35,4
%			-9,2^	-15,8^					-23,2^	-29,3^				-14&

Примечания. * % изменения концентрации глюкозы от значений зафиксированных до ЭСД; # % изменения концентрации глюкозы от значений зафиксированных до ПТТГ; ^ % изменения концентрации глюкозы от значений зафиксированных до начала лечения; % AUC – отличия от значений группы ЭСД; % & AUC - отличия от значений зафиксированных через 14 суток лечения

Гипогликемическая активность соединения ZB-16 и его комбинаций с метформином и ситаглиптином при 4-х недельном пероральном введении животным с ЭСД

	До начала лечения	ПТТГ 14 сут					ПТТГ 28 сут				
		Время, мин				AUC	Время, мин				AUC
		0	30	60	120		0	30	60	120	
Интакт	4,7	4,8	5	5,1	4,8	594,5	4,7	5,1	5,2	4,9	603,5
	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	11,4	0,2	0,1	0,1	0,1	9,9
%		1,1^	4,4#	6,9#	1,5#		-0,6^	9,4#	10,9#	4,1#	
ЭСД	12,7	9	18	16,3	10,5	1722,5	8,5	18,7	15,6	10,1	1691,8
	0,8	1,5	2,2	2,1	1,6	215,7	1,2	1,9	1,5	1,2	163,4
%		-29,1^	99,2#	81,3#	16#	189,8	-33,3^	121#	83,6#	18,7#	180,3
ZB-16	12,7	7,4	13,3	12,8	8	1324,8	6,3	13,5	9,9	7	1155,8
	0,9	0,7	1	1,5	0,5	108,8	0,4	2,7	1,5	0,5	132,3
%		-41,6^	79,6#	72,4#	7,6#	-23,1	-50,1^	113#	56,7#	10,4#	-31,7
Метформин	12,3	6,9	11,8	11,1	7,5	1182,2	5,7	10,9	8,6	6,7	1002,2
	1	0,6	1	1	0,4	82,5	0,5	1,8	1,4	1,1	145,7
%		-43,9^	70,8#	61,1#	9,4#	-31,4	-53,4^	89,7#	50,8#	17,1#	-40,8
Ситаглиптин	12,4	7,7	14,1	11,7	8,1	1307	6,5	12,5	11,1	7,3	1083,4
	1,1	1	2,1	1,7	1,4	187,8	0,7	1,6	2	1	192,2
%		-38,3^	83,2#	52,5#	6,0#	-24,1	-47,5^	92,2#	70,4#	11,5#	-36
ZB-16 + Метформин	12,6	6,1	9,9	8,7	6,4	973,2	5,6	7,9	6,8	6	807
	1,1	0,7	0,9	0,7	0,5	78,5	0,4	0,5	0,2	0,4	30,5
%		-51,3^	62#	41,8#	4,2#	-43,5	-55,6^	42,1#	21,5#	7#	-52,1
ZB-16 + Ситаглиптин	12,3	7,5	14,5	12,5	7,9	1342,1	6,6	13,4	10	6,8	1154,3
	1,2	1,2	3	2,7	1,2	247,2	0,8	3,3	1,7	0,7	195,9
%		-39,5^	94,#	67,4#	5,4#	-22,1	-46,6^	104,2#	51,3#	4#	-31,8
Метформин + Ситаглиптин	12,5	5,7	9,5	8,1	6,2	919,7	5,4	7,9	7	5,7	803,8
	1,2	0,7	0,8	1	0,4	81,4	0,6	0,8	0,7	0,5	77,0
%		-54,3^	66,7#	41,2#	8,2#	-46,6	-56,7^	46,2#	29#	5,5#	-52,5

Примечания. # % изменения концентрации глюкозы от значений зафиксированных до ПТТГ; ^ % изменения концентрации глюкозы от значений зафиксированных до начала лечения; % AUC – отличия от значений группы ЭСД;

Гипогликемическая активность соединения ZB-16 и его комбинаций с метформином и ситаглиптином при 4-х недельном пероральном введении животным с ЭСД

	-3 сут	0 сут					7 сут	14 сут					21 сут	28 сут				
		Время, мин				AUC		Время, мин				AUC		Время, мин				AUC
		0	30	60	120			0	30	60	120			0	30	60	120	
Интакт	4,2	4,07	5	5,3	4,6	588,5	4,7	5,1	6,2	6,6	5,3	714,3	4,5	5	5,4	6	5,8	680,8
	0,2	0,1	0,3	0,2	0,1	18,1	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	9,6	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	6,1
%		-2	23	30,3	13,9		13,3	23,7	20,1	27,6	2,3		9,2	20,1	7,4	21,1	16,4	
ЭСД	4,8	20,2	23,6	26,1	27	2993,8	19,7	17,3	23,6	25	26,6	2890,5	15,1	15,1	19,8	21,4	18	2319,8
	0,12	1,49	0,66	0,47	0,42	58,75	0,75	0,44	0,48	0,4	0,38	42,8	0,31	0,2	0,74	0,74	0,9	35,29
%		317,6*	16,7#	29,3#	33,8#	408,7	307,2*	258,3*	36,3#	44,5#	53,4#	304,7	213,1*	212,4*	31#	41,4#	19#	240,8
%							-2,5^	-14,2^					-25^	-25,2^				-19,7&
ZB-16 1 мг/кг	4,6	19,5	22,7	24,7	23,5	2789	19,3	17,2	19,2	22,5	21,1	2481	14,7	10,5	13,4	14,5	14,7	1651,1
	0,18	0,57	0,6	0,42	0,57	44,65	0,46	0,52	0,66	0,66	0,64	60,01	0,31	0,5	0,59	0,46	0,5	49,03
%		321*	16,5#	26,7#	20,6#	-6,8	317,6*	271*	12,1#	31,3#	22,6#	-14,2	218,5*	127,2*	27,4	37,6	39,5	-28,8
%							-0,8^	-11,9^					-24,3^	-46^				-33,5&
Метформин+ ZB-16 0,1 мг/кг	4,7	19,9	22,7	26,3	23,6	2873,3	19,6	15,4	20,4	21,7	17	2326,2	13,8	9,2	13,7	14,8	13	1607,6
	0,16	0,66	0,77	0,55	0,62	60,92	0,48	0,46	0,7	0,67	0,3	37,4	0,55	0,31	0,48	0,48	0,96	56,67
%		321,5*	14,5#	32,4#	18,9#	-4	315,8*	227,6*	31,8#	40,3#	9,8#	-19,5	192,4*	95,5*	49#	61,1#	40,9#	-30,7
%							-1,4^	-22,3^					-30,6^	-53,6^				-30,9&
Метформин+ ZB-16 1 мг/кг	4,7	20,4	22,3	24,1	21,8	2712,2	18,8	15,9	20,3	21,2	17,4	2323,9	14	9,4	12,5	14,5	12,6	1544,8
	0,17	0,48	0,48	0,45	0,38	45,03	0,35	0,48	0,84	0,83	0,42	69,27	0,23	0,28	0,39	0,19	0,18	15,61
%		337,6*	9,3#	17,7#	6,4#	-9,4	302,1*	241*	27,7#	32,9#	9,2#	-19,6	200,6*	100,3*	33,6#	54,5#	35#	-33,4
%							-8,1^	-22,1^					-31,3^	-54,2^				-33,5&
Метформин 400 мг/кг	4,9	20,3	23,2	25,7	22,1	2816,8	19	16,8	21,4	22,8	22,1	2584,5	14,6	10,2	13,6	15,6	15,5	1729,5
	0,08	0,68	0,46	0,25	0,6	35,82	0,31	0,55	0,56	0,6	0,69	44,6	0,24	0,46	0,62	0,34	0,26	38,94
%		313,4*	14,5#	26,7#	9#	-5,9	286,9*	243,4*	27,1#	35,7#	31,2#	-10,6	198*	107,9*	33,2#	53,4#	52,6#	-25,4
%							-6,4^	-16,9^					-27,9^	-49,7^				-33,1&

Примечания. * % изменения концентрации глюкозы от значений зафиксированных до ЭСД; # % изменения концентрации глюкозы от значений зафиксированных до ПТТГ; ^ % изменения концентрации глюкозы от значений зафиксированных до начала лечения; % AUC – отличия от значений группы ЭСД; % & AUC – отличия от значений зафиксированных через 14 суток лечения

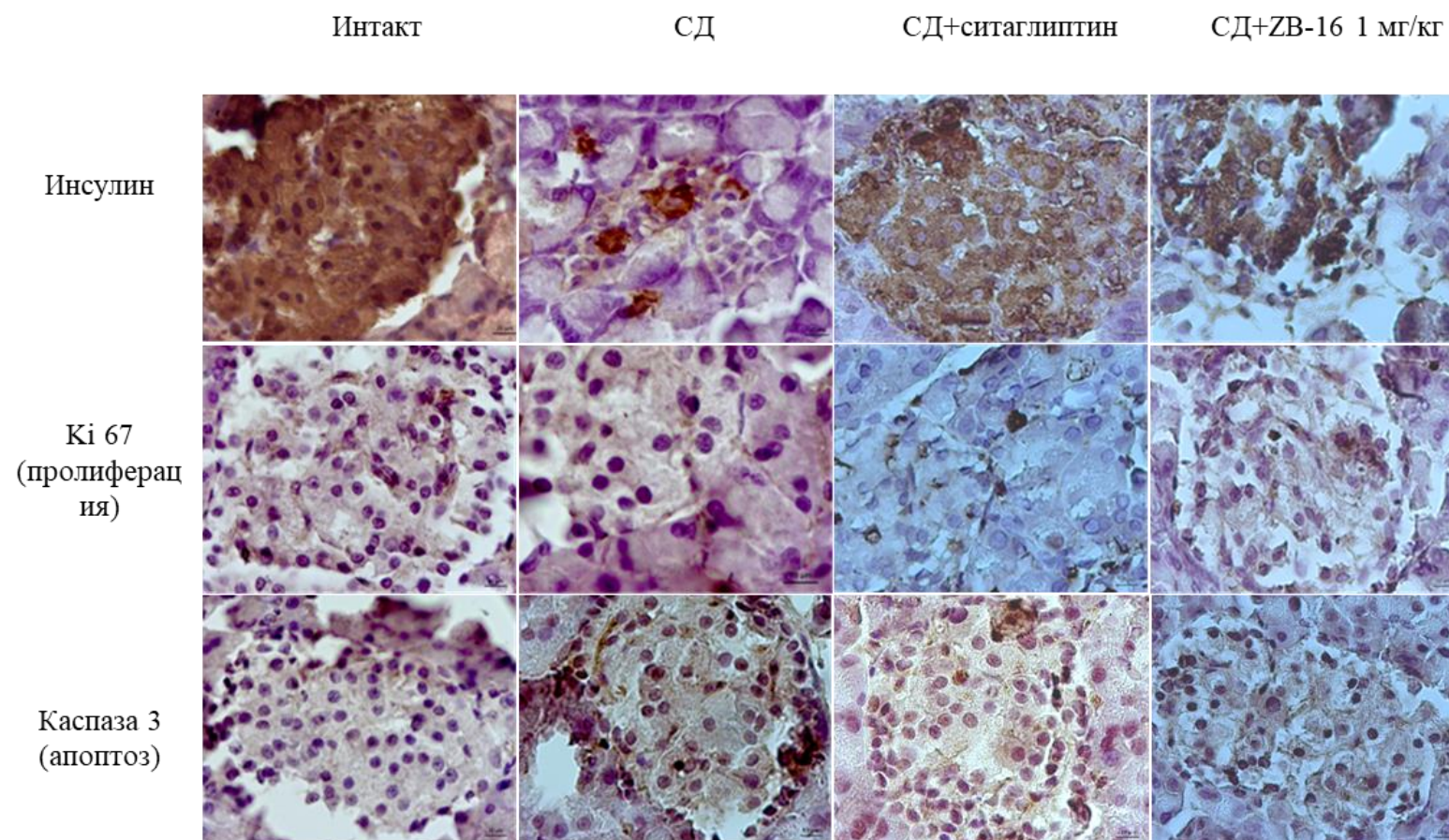
Изменение морфометрических параметров панкреатических островков с использованием ИГХ окрашивания антителами к инсулину и против каспаза-3

Морфометрический параметр	Площадь островков, мкм ²	Площадь инсулин-позитивных эндокриноцитов, мкм ²	Относительная площадь инсулин-позитивных эндокриноцитов, %	Периметр островков, мкм
ИГХ окрашивания антителами к инсулину				
Интактная группа	6885,16 ± 969,3	4449,51 ± 903,9	61,61 ± 5,7	364,45 ± 20,7
Контрольная группа (СД)	1179,01 ± 47,2***	201,40 ± 16,7**	17,38 ± 1,7***	145,93 ± 6,0***
Группа Z16 (1 мг/кг)	7198,23 ± 566,0###	2491,27 ± 63,5###	36,11 ± 2,2***###	351,37 ± 21,8###

Морфометрический параметр	Площадь островков, мкм ²	Площадь каспаза 3-позитивных эндокриноцитов, мкм ²	Дельта площади каспаза 3-позитивных эндокриноцитов, %	Относительная площадь каспаза 3-позитивных эндокриноцитов, %	Дельта отн. площади каспаза 3-позитивных эндокриноцитов, %
ИГХ окрашивания антителами к каспазе 3					
Интактная группа	7375,93 ± 621,6	117,10 ± 4,9		1,66 ± 0,1	
Контрольная группа (СД)	2427,99 ± 862,7**	129,02 ± 40,2	+10,2	5,90 ± 0,4***	+4,2
Группа Z16 (1 мг/кг)	7170,55 ± 479,7##	75,0 ± 4,8***	-41,9 СД -35,9 к Интакту	1,05 ± 0,03###	-4,9 к СД

Примечания. по сравнению с интактной группой: ** p<0,01; *** p<0,001. По сравнению с контрольной группой: ## p<0,01; ### p<0,001.

Обобщенные морфологические изменения в островках поджелудочной железы окрашенных мышинными моноклональными антителами к инсулину, Ki 67 и против каспаза-3 с диаминобензидином в качестве хромогенного субстрата и дополнительной окраской с помощью гематоксилина в увеличении x40



Средний товарооборот или объём закупки организаций, от которых была получена информация о рынке гипогликемических лекарственных средств РФ за 2016 год

Выборка Аптеки									
Федеральный округ	Субъект РФ	Региональный центр	АС		А	В	С	D	E
			+	-					
			Товарооборот, тысячи рублей						
					↑ 2 900	1 450 - 2 899	440 – 1 499	145 - 439	↓ 145
Центральный ФО	6060	3770	4150	1910	421	1126	3282	1030	201
Северо-Западный ФО	1350	970	810	540	49	176	692	327	106
Южный ФО	1580	890	1062	520	43	142	727	463	207
Приволжский ФО	5020	2470	3730	1290	178	646	2469	1266	461
Уральский ФО	1760	710	1180	580	213	334	855	302	56
Сибирский ФО	2780	1380	1650	1130	126	366	1426	694	168
Дальневосточный ФО	400	320	320	80	14	41	155	136	54
Крымский ФО	180	100	80	100	10	46	88	23	13
Итого:	19130	10610	12982	6150	1054	2877	9694	4241	1266

Выборка ЛПУ							
Федеральный округ	Субъект РФ	Региональный центр	A	B	C	D	E
			Объем закупки, тысячи рублей				
			↑ 2 900	1 450 - 2 899	440 – 1 499	145 - 439	↓ 145
Центральный ФО	17700	8783	2600	3591	7211	3588	710
Северо-Западный ФО	5078	2694	579	1020	1745	1091	643
Южный ФО	9352	3014	305	952	3028	2015	917
Приволжский ФО	12180	5022	1203	2159	5710	2066	1042
Уральский ФО	4555	1596	747	1419	1766	479	144
Сибирский ФО	7521	3030	739	1357	3358	1312	671
Дальневосточный ФО	2315	934	85	182	696	690	317
Крымский ФО	740	263	0	0	0	0	0
Итого	84777	31594	16938	34194	34755	15685	4444

Объем продаж гипогликемических ЛП (кроме инсулина и его аналогов) в аптеки РФ за 2016 год, упак.

МНН\Квартал	1 квартал	2 квартал	3 квартал	4 квартал	Итого за год:
акарбоза	2 820	2 245	2 240	2 157	9 462
алоглиптин	9 318	14 951	17 997	25 175	67 441
вилдаглиптин	124 644	154 258	165 639	172 893	617 434
вилдаглиптин+метформин	148 864	166 003	154 994	163 237	633 098
глибенкламид	443 101	467 145	457 055	488 244	1 855 545
глибенкламид+метформин	695 977	739 082	715 942	773 000	2 924 001
гликвидон	31 028	32 887	32 211	33 509	129 635
гликлазид	1 161 175	1 293 306	1 328 997	1 487 491	5 270 969
гликлазид+метформин	7 757	9 172	8 863	9 139	34 931
глимепирид	198 469	214 721	224 600	228 360	866 150
глимепирид+метформин	31 455	36 651	39 318	43 248	150 672
глипизид	436	1	0	0	437
дапаглифлозин	11 546	18 692	23 073	32 364	85 675
канаглифлозин	94	187	322	296	899
ликсисенатид	57	104	148	75	384
линаглиптин	7 611	9 791	9 761	10 840	38 003
лираглутид	3 758	3 643	4 522	5 521	17 444
метформин	2 344 349	2 588 320	2 621 749	2 922 432	10 476 850
метформин пролонг	114 475	128 976	146 971	176 421	566 843
метформин+(сибутрамин+целлюлоза микрокристаллическая)	3 091	3 755	4 103	4 416	15 365
метформин+росиглитазон	66	13	0	2	81
метформин+саксаглиптин	6 147	7 942	6 265	5 981	26 335
метформин+ситаглиптин	11 351	14 215	12 826	15 141	53 533
пиоглитазон	24	5	17	13	59
ситаглиптин	13 237	15 565	14 017	19 488	62 307
эксенатид	1 147	1 467	1 238	1 554	5 406
эмпаглифлозин	2 474	5 505	5 878	9 185	23 042
Итого:	5 374 471	5 928 602	5 998 746	6 630 182	23 932 001

Объем продаж гипогликемических ЛП (кроме инсулина и его аналогов) в аптеки РФ за 2016 год, руб.

МНН\Квартал	1 квартал	2 квартал	3 квартал	4 квартал	Итого за год:
акарбоза	1 269 255	1 034 200	1 020 899	1 033 811	4 358 165
алоглиптин	8 797 191	15 948 278	19 497 796	27 326 033	71 569 298
вилдаглиптин	83 954 379	101 554 925	109 290 372	116 638 259	411 437 935
вилдаглиптин+метформин	198 446 565	222 450 727	202 971 552	213 508 557	837 377 401
глибенкламид	53 323 394	56 897 284	54 367 329	57 821 549	222 409 556
глибенкламид+метформин	160 512 919	175 835 625	173 654 256	190 479 486	700 482 286
гликвидон	11 218 268	12 545 730	12 278 638	12 391 168	48 433 804
гликлазид	275 740 035	308 408 441	306 051 903	344 091 578	1 234 291 957
гликлазид+метформин	2 299 609	3 146 169	3 103 524	3 199 122	11 748 424
глимепирид	108 562 670	118 523 656	119 515 297	125 084 376	471 685 999
глимепирид+метформин	16 459 628	19 762 499	21 374 810	25 135 417	82 732 354
глипизид	60 624	911	0	0	61 535
дапаглифлозин	26 703 972	39 955 865	49 444 123	69 073 121	185 177 081
канаглифлозин	241 639	634 104	961 190	856 819	2 693 752
ликсисенатид	259 879	410 048	542 328	289 525	1 501 780
линаглиптин	11 162 681	14 866 750	14 796 954	16 486 507	57 312 892
лираглутид	35 247 716	34 988 641	39 377 183	51 023 771	160 637 311
метформин	500 955 733	552 788 500	547 525 357	606 354 289	2 207 623 879
метформин пролонг	45 334 698	51 384 375	56 915 162	68 372 953	222 007 188
метформин+(сIBUTрамин+целлюлоза микрокристаллическая)	5 460 377	6 410 958	7 097 740	7 801 649	26 770 724
метформин+росиглитазон	90 148	16 872	0	566	107 586
метформин+саксаглиптин	14 842 385	19 511 483	15 650 331	15 259 770	65 263 969
метформин+ситаглиптин	25 121 855	33 745 645	30 947 698	36 474 361	126 289 559
пиоглитазон	10 664	4 778	13 377	9 702	38 521
ситаглиптин	25 079 944	27 199 889	23 198 479	28 883 413	104 361 725
эксенатид	5 423 326	6 616 160	5 565 392	7 624 681	25 229 559
эмпаглифлозин	4 075 739	8 779 133	10 671 403	17 745 408	41 271 683
Итого:	1 620 655 293	1 833 421 646	1 825 833 093	2 042 965 891	7 322 875 923

Объем продаж гипогликемических ЛП (кроме инсулина и его аналогов) из аптек РФ за 2016 год, руб.

МНН\Квартал	1 квартал	2 квартал	3 квартал	4 квартал	Итого за год:
акарбоза	1 589 229	1 265 942	1 235 791	1 266 417	5 357 379
алоглиптин	10 735 802	18 919 490	22 712 573	31 800 331	84 168 196
вилдаглиптин	98 593 207	118 717 821	127 797 395	136 433 327	481 541 750
вилдаглиптин+метформин	239 138 946	264 884 320	244 933 676	259 349 387	1 008 306 329
глибенкламид	63 397 079	68 087 775	65 062 835	69 371 333	265 919 022
глибенкламид+метформин	205 487 226	223 152 023	218 793 430	237 737 542	885 170 221
гликвидон	13 806 102	15 020 437	14 862 636	15 208 816	58 897 991
гликлазид	334 402 999	377 043 951	370 128 293	414 352 948	1 495 928 191
гликлазид+метформин	3 011 375	3 939 181	3 915 135	3 961 058	14 826 749
глимепирид	134 631 499	147 002 304	148 561 345	154 967 771	585 162 919
глимепирид+метформин	20 359 339	24 096 431	26 076 258	30 124 546	100 656 574
глипизид	89 214	1 048	0	0	90 262
дапаглифлозин	32 248 522	47 675 665	57 869 077	80 709 530	218 502 794
канаглифлозин	291 608	751 609	1 155 023	1 061 850	3 260 090
ликсисенатид	319 261	502 079	696 488	367 859	1 885 687
линаглиптин	13 507 099	17 833 390	17 622 298	19 592 441	68 555 228
лираглутид	42 461 979	42 340 877	49 515 069	62 046 003	196 363 928
метформин	606 832 434	663 632 434	660 042 520	728 507 873	2 659 015 261
метформин пролонг	55 302 380	61 986 562	68 374 974	82 202 746	267 866 662
метформин+(сибутрамин+целлюлоза микрокристаллическая)	6 518 708	7 731 026	8 603 764	9 660 503	32 514 001
метформин+росиглитазон	110 691	21 253	0	734	132 678
метформин+саксаглиптин	17 682 203	23 127 641	18 659 919	18 088 652	77 558 415
метформин+ситаглиптин	30 258 084	40 614 117	37 273 443	44 123 652	152 269 296
пиоглитазон	12 629	6 168	15 390	11 159	45 346
ситаглиптин	29 798 239	32 479 479	27 564 983	34 205 461	124 048 162
эксенатид	6 938 118	8 490 104	6 746 308	8 963 279	31 137 809
эмпаглифлозин	4 938 584	10 978 119	12 971 403	21 688 213	50 576 319
Итого:	1 972 462 556	2 220 301 246	2 211 190 026	2 465 803 431	8 869 757 259

Средневзвешенная цена закупки гипогликемических ЛП (кроме инсулина и его аналогов) аптеками РФ за 2016 год.

МНН\Квартал	1 квартал	2 квартал	3 квартал	4 квартал	За год:
акарбоза	459,29	479,33	470,83	526,29	470,32
алоглиптин	893,44	1 012,10	975,48	998,95	964,16
вилдаглиптин	668,75	681,16	658,23	689,19	665,96
вилдаглиптин+метформин	1 359,71	1 369,09	1 320,29	1 316,18	1 330,81
глибенкламид	78,25	70,35	87,47	96,02	84,85
глибенкламид+метформин	206,77	210,46	203,70	198,66	204,32
гликвидон	360,55	392,44	367,77	369,43	373,56
гликлазид	162,92	172,14	162,97	182,24	166,69
гликлазид+метформин	299,07	319,71	298,76	308,20	300,69
глимепирид	474,62	461,42	444,73	450,91	455,04
глимепирид+метформин	507,83	553,73	551,78	593,87	546,63
глипизид	530,51				735,01
дапаглифлозин	2 203,10	1 669,10	1 549,27	1 697,29	1 841,34
канаглифлозин	173,91	173,80	166,82	163,92	172,67
ликсисенатид	283,81	290,42	277,74	274,79	281,98
линаглиптин	1 412,59	1 438,21	1 384,86	1 443,08	1 425,84
лираглутид	1 465,73	1 429,67		283,00	1 090,14
метформин	2 350,17	2 474,31	2 459,25	2 585,55	2 480,89
метформин пролонг	2 249,15	2 463,61	2 466,18	2 426,44	2 355,01
метформин+(сибутрамин+целлюлоза микрокристаллическая)	551,10	924,25	735,15		758,93
метформин+росиглитазон	1 834,38	1 806,16	1 566,89	1 463,54	1 699,09
метформин+саксаглиптин	4 264,83	4 354,36	4 339,90	4 865,06	4 447,24
метформин+ситаглиптин	1 647,03	1 535,00	1 435,71	1 513,21	1 482,46
пиоглитазон	459,29	479,33	470,83	526,29	470,32
ситаглиптин	893,44	1 012,10	975,48	998,95	964,16
эксенатид	668,75	681,16	658,23	689,19	665,96
эмпаглифлозин	1 359,71	1 369,09	1 320,29	1 316,18	1 330,81
акарбоза	78,25	70,35	87,47	96,02	84,85
Итого:	539,85	537,80	501,37	507,40	519,25

Приложение 16

Объем продаж инсулина и его аналогов в аптеки РФ за 2016 год, упак.

МНН\Квартал	1 квартал	2 квартал	3 квартал	4 квартал	Итого за год:
инсулин аспарт	15 299	12 130	13 326	16 883	57 638
инсулин аспарт двухфазный	8 634	7 784	7 504	11 866	35 788
инсулин аспарт+инсулин деглудек	4	18	17	128	167
инсулин гларгин	16 669	13 428	11 747	16 893	58 737
инсулин глулизин	3 538	2 645	2 950	4 714	13 847
инсулин двухфазный человеческий генно-инженерный	13 208	11 542	7 656	11 057	43 463
инсулин двухфазный человеческий полусинтетический	784	1 316	1 081	1 615	4 796
инсулин деглудек	176	320	330	721	1 547
инсулин детемир	9 450	6 840	6 918	9 842	33 050
инсулин лизпро	8 049	6 192	4 961	8 126	27 328
инсулин лизпро двухфазный	1 247	1 896	1 779	3 105	8 027
инсулин растворимый человеческий генно-инженерный	71 142	64 865	56 796	75 394	268 197
инсулина-цинк человеческого генно-инженерного комбинированного суспензия	50	184	431	2	667
инсулин-изофан человеческий генно-инженерный	101 676	93 037	85 045	107 246	387 004
инсулин-изофан человеческий полусинтетический	26	0	0	267	293
Итого:	249 952	222 197	200 541	267 859	940 549

Объем продаж инсулина и его аналогов в аптеки РФ за 2016 год, руб.

МНН\Квартал	1 квартал	2 квартал	3 квартал	4 квартал	Итого за год:
инсулин аспарт	25 130 984	21 052 477	21 531 943	28 359 653	96 075 057
инсулин аспарт двухфазный	12 795 925	11 914 072	11 110 591	18 231 859	54 052 447
инсулин аспарт+инсулин деглудек	29 048	124 989	93 884	918 203	1 166 124
инсулин гларгин	54 104 101	43 272 621	36 591 803	53 974 941	187 943 466
инсулин глулизин	5 860 391	4 931 994	5 274 539	8 623 755	24 690 679
инсулин двухфазный человеческий генно-инженерный	10 308 028	9 802 872	6 196 930	9 808 752	36 116 582
инсулин двухфазный человеческий полусинтетический	348 925	621 380	512 410	763 075	2 245 790
инсулин деглудек	1 343 773	2 439 757	2 299 956	5 183 647	11 267 133
инсулин детемир	21 374 421	16 579 623	16 340 681	23 547 475	77 842 200
инсулин лизпро	13 094 826	10 559 535	8 153 387	13 361 778	45 169 526
инсулин лизпро двухфазный	2 045 158	3 201 954	2 967 137	5 257 465	13 471 714
инсулин растворимый человеческий генно-инженерный	45 368 736	39 685 577	30 939 759	42 217 497	158 211 569
инсулина-цинк человеческого генно-инженерного комбинированного суспензия	21 869	73 851	174 525	775	271 020
инсулин-изофан человеческий генно-инженерный	68 242 762	60 697 697	49 315 581	61 051 678	239 307 718
инсулин-изофан человеческий полусинтетический	9 457	0	0	438 813	448 270
Итого:	260 078 404	224 958 399	191 503 126	271 739 366	948 279 295

Объем продаж инсулина и его аналогов из аптек РФ за 2016 год, руб.

МНН\Квартал	1 квартал	2 квартал	3 квартал	4 квартал	Итого за год:
инсулин аспарт	30 052 049	24 125 594	25 499 336	33 193 959	112 870 938
инсулин аспарт двухфазный	14 903 343	13 697 614	12 830 948	21 553 847	62 985 752
инсулин аспарт+инсулин деглудек	33 406	148 750	134 090	1 130 561	1 446 807
инсулин гларгин	63 621 592	49 639 423	42 332 066	62 502 696	218 095 777
инсулин глулизин	7 186 412	5 689 223	6 377 402	9 917 032	29 170 069
инсулин двухфазный человеческий генно-инженерный	12 312 607	11 233 149	7 074 211	11 749 465	42 369 432
инсулин двухфазный человеческий полусинтетический	445 391	805 168	640 302	979 917	2 870 778
инсулин деглудек	1 545 229	2 798 779	2 799 081	6 217 611	13 360 700
инсулин детемир	25 507 431	19 062 131	18 852 385	27 449 511	90 871 458
инсулин лизпро	16 012 582	12 472 340	9 534 875	15 625 074	53 644 871
инсулин лизпро двухфазный	2 385 980	3 680 761	3 383 271	6 004 057	15 454 069
инсулин растворимый человеческий генно-инженерный	54 191 815	46 789 977	36 198 706	50 603 951	187 784 449
инсулина-цинк человеческого генно-инженерного комбинированного суспензия	26 312	95 985	225 404	1 008	348 709
инсулин-изофан человеческий генно-инженерный	84 858 649	73 289 734	59 885 727	73 745 291	291 779 401
инсулин-изофан человеческий полусинтетический	11 531	0	0	565 893	577 424
Итого:	313 094 329	263 528 628	225 767 804	321 239 873	1 123 630 634

Средневзвешенная цена закупки инсулина и его аналогов аптеками РФ за 2016 год, руб.

МНН\Квартал	1 квартал	2 квартал	3 квартал	4 квартал	За год:
инсулин аспарт	1 256,11	1 717,14	1 561,69	1 702,58	1 578,24
инсулин аспарт двухфазный	1 486,05	1 529,21	1 455,01	1 548,89	1 512,38
инсулин аспарт+инсулин деглудек	7 262,00	6 142,11	5 754,00	7 554,85	6 560,32
инсулин гларгин	2 326,39	2 324,27	2 235,34	2 937,64	2 480,05
инсулин глулизин	1 289,53	1 905,20	1 795,64	1 857,33	1 662,26
инсулин двухфазный человеческий генно-инженерный	778,63	981,14	894,99	933,26	887,75
инсулин двухфазный человеческий полусинтетический	428,40	483,69	475,59	468,73	466,49
инсулин деглудек	7 526,78	7 455,61	6 888,76	7 410,55	7 342,76
инсулин детемир	1 715,14	2 478,84	2 334,51	2 413,76	2 201,98
инсулин лизпро	1 663,57	1 694,12	1 656,34	1 659,09	1 656,53
инсулин лизпро двухфазный	1 693,08	1 700,05	1 679,26	1 299,84	1 588,37
инсулин растворимый человеческий генно-инженерный	759,33	803,19	715,60	780,58	759,14
инсулина-цинк человеческого генно-инженерного комбинированного суспензия	363,76	402,46	397,76	387,50	404,71
инсулин-изофан человеческий генно-инженерный	739,47	948,93	781,86	842,91	831,58
инсулин-изофан человеческий полусинтетический	465,33			1 632,78	1 051,93
Итого:	1 128,59	1 306,27	1 190,77	1 334,48	1 220,12

Объем продаж гипогликемических ЛП (кроме инсулина и его аналогов) в ЛПУ РФ за 2016 год, упак.

МНН\Квартал	1 квартал	2 квартал	3 квартал	4 квартал	Итого за год:
акарбоза	3	24	48	78	153
алоглиптин	0	417	1 197	504	2 118
вилдаглиптин	11 679	9 972	25 389	38 361	85 401
вилдаглиптин+метформин	15 333	17 022	29 481	44 427	106 263
глибенкламид	62 154	34 956	44 733	50 733	192 576
глибенкламид+метформин	48 168	50 202	93 144	311 805	503 319
гликвидон	4 155	4 986	3 297	4 416	16 854
гликлазид	362 472	370 884	388 212	742 740	1 864 308
гликлазид+метформин	2 244	2 142	2 892	9 150	16 428
глимепирид	41 385	46 854	54 693	51 624	194 556
глимепирид+метформин	10 956	14 823	15 405	20 361	61 545
дапаглифлозин	174	1 722	1 224	1 443	4 563
ликсисенатид	0	0	81	42	123
линаглиптин	792	1 248	4 044	4 239	10 323
лираглутид	522	648	429	411	2 010
метформин	485 262	215 244	283 794	663 840	1 648 140
метформин пролонг	4 167	6 114	5 901	51 714	67 896
метформин+(сIBUTрамин+целлюлоза микрокристаллическая)	75	21	6	54	156
метформин+росиглитазон	0	0	0	3	3
метформин+саксаглиптин XR	186	795	522	87	1 590
метформин+саксаглиптин	213	60	162	606	1 041
метформин+ситаглиптин	2 064	1 170	1 197	1 167	5 598
пиоглитазон	12	141	228	231	612
ситаглиптин	891	1 338	3 939	3 615	9 783
эксенатид	396	579	375	354	1 704
эмпаглифлозин	210	288	402	762	1 662
Итого:	1 053 513	781 650	960 795	2 002 767	4 798 725

Приложение 21

Объем продаж гипогликемических ЛП (кроме инсулина и его аналогов) в ЛПУ РФ за 2016 год, руб.

МНН\Квартал	1 квартал	2 квартал	3 квартал	4 квартал	Итого за год:
акарбоза	3 444	12 075	28 245	48 627	92 391
алоглиптин	0	417 360	1 525 605	640 419	2 583 384
вилдаглиптин	8 648 151	7 305 834	17 350 020	23 991 243	57 295 248
вилдаглиптин+метформин	24 551 655	26 767 140	42 420 237	58 698 921	152 437 953
глибенкламид	8 885 094	4 365 120	5 671 119	6 293 799	25 215 132
глибенкламид+метформин	9 569 112	11 653 719	18 919 002	64 221 456	104 363 289
гликвидон	1 129 731	1 620 447	1 059 783	1 498 218	5 308 179
гликлазид	53 056 476	51 010 905	58 128 933	107 563 725	269 760 039
гликлазид+метформин	563 163	742 671	888 105	2 678 007	4 871 946
глимепирид	8 803 851	8 601 864	11 672 721	16 760 037	45 838 473
глимепирид+метформин	5 605 944	8 415 636	8 631 321	10 629 576	33 282 477
дапаглифлозин	434 148	3 615 561	2 631 069	3 091 245	9 772 023
ликсисенатид	0	0	365 886	167 430	533 316
линаглиптин	1 484 118	2 391 627	5 278 458	5 709 921	14 864 124
лираглутид	5 399 604	7 084 242	4 673 139	4 581 309	21 738 294
метформин	96 457 230	44 448 975	48 176 814	112 998 783	302 081 802
метформин пролонг	1 398 534	2 077 122	2 112 783	14 421 165	20 009 604
метформин+(сIBUTрамин+целлюлоза микрокристаллическая)	118 797	33 225	8 892	102 978	263 892
метформин+росиглитазон	0	0	0	4 080	4 080
метформин+саксаглиптин XR	545 172	2 173 335	1 429 290	230 679	4 378 476
метформин+саксаглиптин	606 156	158 226	388 416	1 323 939	2 476 737
метформин+ситаглиптин	5 187 552	2 828 697	2 941 392	2 778 060	13 735 701
пиоглитазон	7 677	137 730	230 076	238 002	613 485
ситаглиптин	1 925 634	2 374 536	6 998 202	6 358 956	17 657 328
эксенатид	2 322 261	1 425 870	1 256 700	1 595 889	6 600 720
эмпаглифлозин	429 993	569 526	968 067	1 778 967	3 746 553
Итого:	237 133 497	190 231 443	243 754 275	448 405 431	1 119 524 646

Средневзвешенная цена закупки гипогликемических ЛП (кроме инсулина и его аналогов) ЛПУ РФ за 2016 год.

МНН\Квартал	Конец 1 квартала	Конец 2 квартала	Конец 3 квартала	Конец 4 квартала	За год:
акарбоза	1 148,00	525,42	701,96	661,26	703,61
алоглиптин		1 000,86	1 274,52	1 061,60	1 099,64
вилдаглиптин	740,49	732,63	683,37	625,41	695,48
вилдаглиптин+метформин	2 236,53	1 573,35	1 283,50	1 342,95	1 630,72
глибенкламид	146,29	93,59	88,75	71,55	101,92
глибенкламид+метформин	196,13	235,19	206,25	191,52	206,78
гликвидон	394,00	462,92	321,44	339,27	395,76
гликлазид	143,63	143,95	144,83	131,30	140,67
гликлазид+метформин	272,72	299,53	262,10	254,55	272,22
глимепирид	517,72	626,80	509,04	480,86	533,91
глимепирид+метформин	538,58	610,67	619,88	522,06	580,04
дапаглифлозин	2 503,39	2 369,44	2 499,08	1 869,81	2 310,43
ликсисенатид			5 004,31	4 902,76	4 953,53
линаглиптин	1 873,89	1 916,37	1 305,26	1 347,00	1 610,63
лираглутид	10 344,07	10 932,47	10 893,10	11 146,74	10 829,10
метформин	169,02	169,73	172,07	162,44	168,22
метформин пролонг	238,49	238,69	330,83	223,85	257,96
метформин+(сIBUTрамин+целлюлоза микрокристаллическая)	1 776,27	1 703,42	1 482,00	1 966,21	1 778,82
метформин+росиглитазон				1 360,00	1 360,00
метформин+саксаглиптин XR	2 931,03	2 733,75	2 738,10	2 651,48	2 763,59
метформин+саксаглиптин	2 845,80	2 457,16	2 388,93	2 168,90	2 410,82
метформин+ситаглиптин	2 529,80	2 581,69	2 383,33	2 300,86	2 448,92
пиоглитазон	639,75	777,87	652,91	1 030,31	733,57
ситаглиптин	2 161,21	1 774,69	1 656,92	1 775,00	1 799,95
эксенатид	5 154,94	2 984,61	3 797,97	4 153,63	4 022,79
эмпаглифлозин	2 234,37	1 767,27	1 952,86	1 888,58	1 933,56
Итого:	684,35	640,19	640,19	640,19	692,79

Приложение 23

Объем продаж инсулина и его аналогов в ЛПУ РФ за 2016 год, упак.

МНН\Квартал	1 квартал	2 квартал	3 квартал	4 квартал	Итого за год:
инсулин аспарт	35 529	27 234	25 371	37 797	125 931
инсулин аспарт двухфазный	29 259	21 585	21 597	27 207	99 648
инсулин аспарт+инсулин деглудек	24	51	399	504	978
инсулин гларгин	46 095	24 252	30 600	49 683	150 630
инсулин глулизин	10 887	7 737	7 779	10 635	37 038
инсулин двухфазный человеческий генно-инженерный	36 042	14 592	5 598	9 435	65 667
инсулин деглудек	768	729	840	1 182	3 519
инсулин детемир	32 538	16 839	28 074	39 180	116 631
инсулин лизпро	25 713	14 886	11 832	26 298	78 729
инсулин лизпро двухфазный	11 997	3 066	588	921	16 572
инсулин растворимый человеческий генно-инженерный	101 067	78 876	122 295	170 580	472 818
инсулин-изофан человеческий генно-инженерный	116 364	79 077	112 353	171 405	479 199
инсулин-изофан человеческий полусинтетический	1 098	2 160	2 391	3 627	9 276
Итого:	447 381	291 084	369 717	548 454	1 656 636

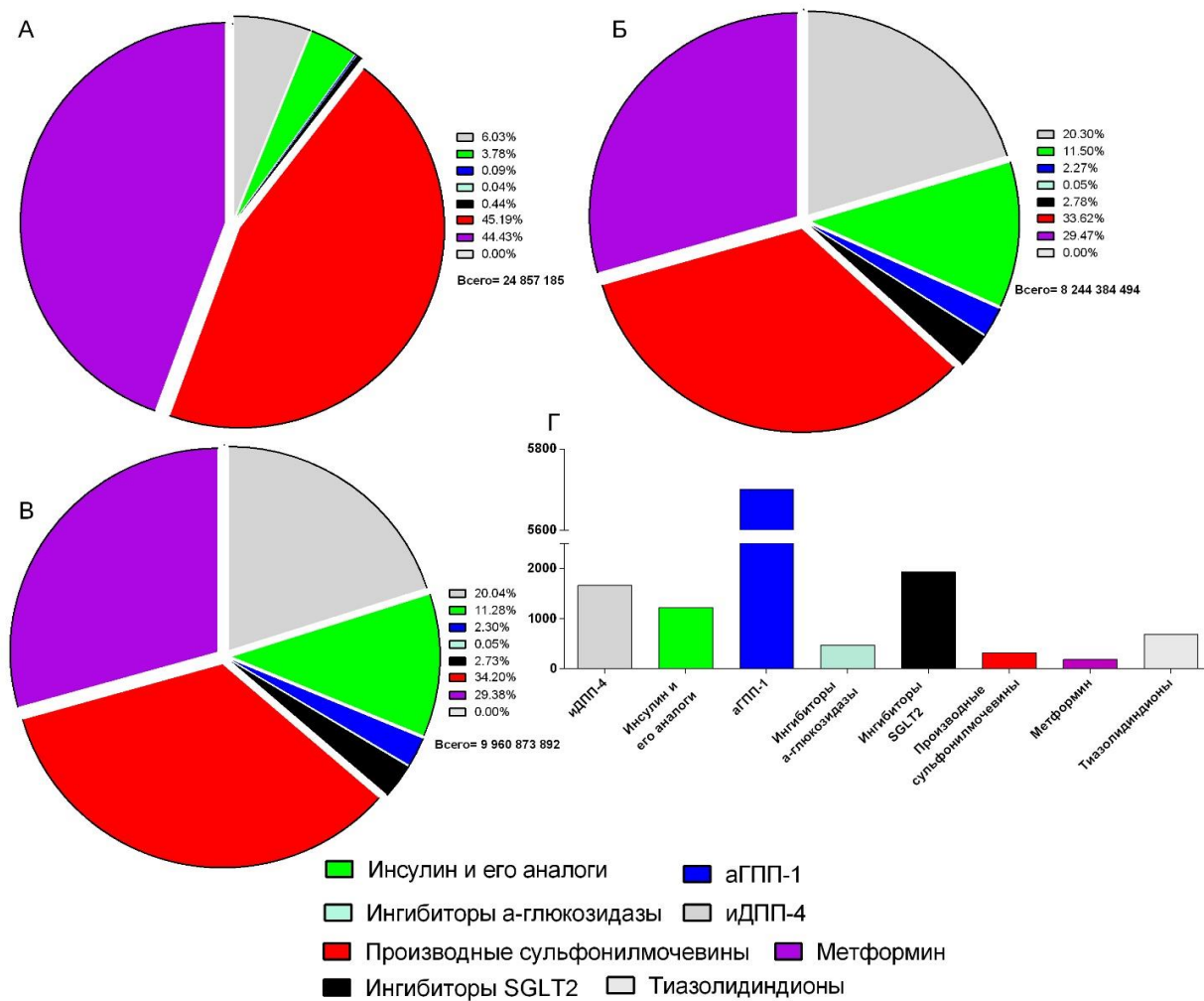
Объем продаж инсулина и его аналогов в ЛПУ РФ за 2016 год, руб.

МНН\Квартал	1 квартал	2 квартал	3 квартал	4 квартал	Итого за год:
инсулин аспарт	58 756 545	46 281 441	41 332 551	58 384 392	204 754 929
инсулин аспарт двухфазный	42 648 336	32 958 708	33 215 229	40 226 253	149 048 526
инсулин аспарт+инсулин деглудек	90 429	406 977	2 857 332	2 752 626	6 107 364
инсулин гларгин	154 670 523	81 748 839	95 858 508	148 780 890	481 058 760
инсулин глулизин	19 800 753	13 800 156	13 011 966	17 890 341	64 503 216
инсулин двухфазный человеческий генно-инженерный	29 248 989	10 859 934	4 113 864	6 912 294	51 135 081
инсулин двухфазный человеческий полусинтетический	5 604 051	5 593 737	6 459 312	8 856 627	26 513 727
инсулин деглудек	76 995 051	41 514 282	64 900 188	87 434 388	270 843 909
инсулин детемир	44 365 029	26 321 736	19 108 551	39 946 203	129 741 519
инсулин лизпро	18 661 389	4 741 248	808 629	1 098 375	25 309 641
инсулин лизпро двухфазный	67 516 941	47 526 846	71 728 725	95 048 145	281 820 657
инсулин растворимый человеческий генно-инженерный	81 493 329	55 479 999	83 863 554	127 024 089	347 860 971
инсулина-цинк человеческого генно-инженерного комбинированного суспензия	564 219	809 538	816 759	1 192 218	3 382 734
Итого:	600 415 584	368 043 441	438 075 168	635 546 841	2 042 081 034

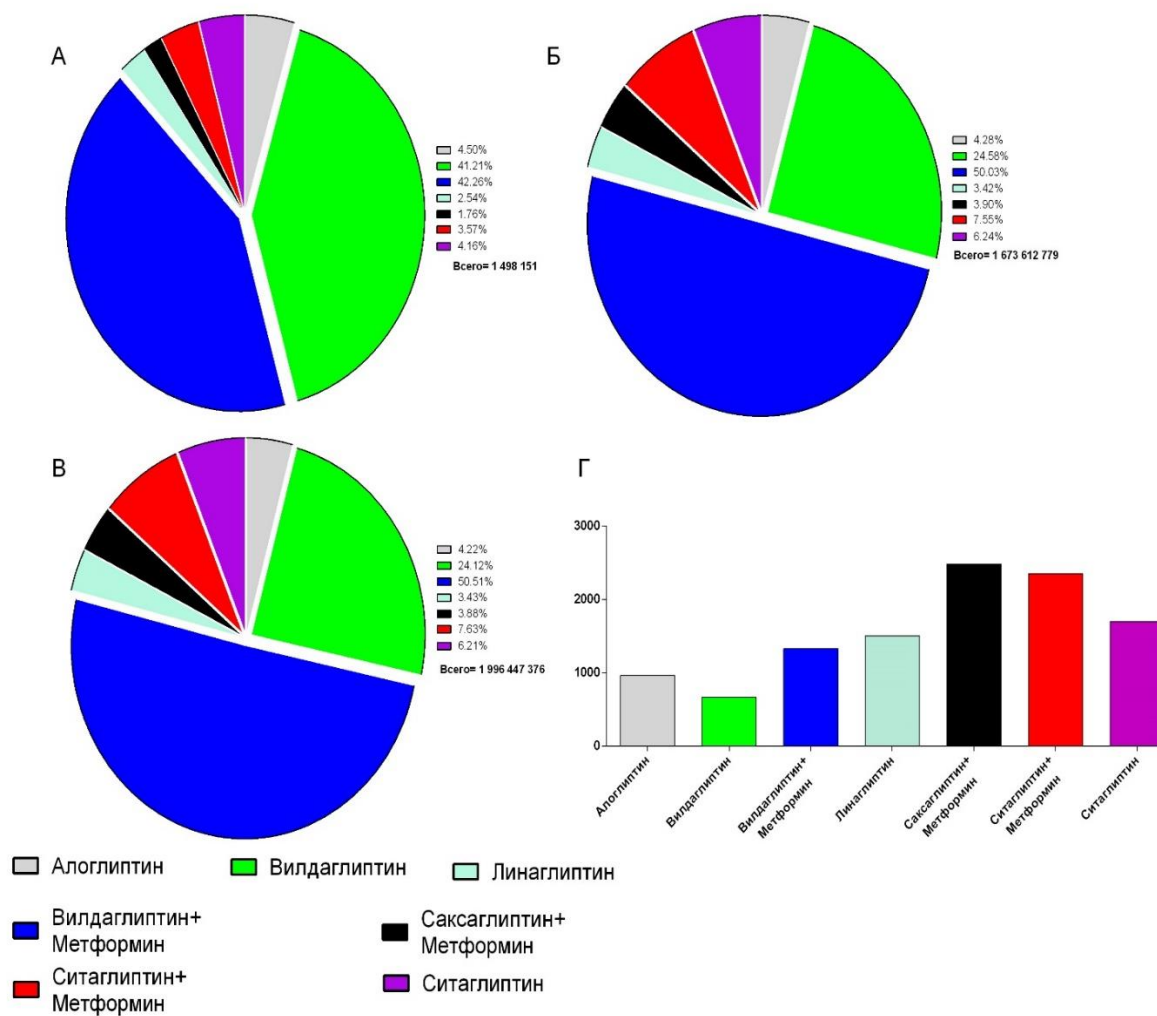
Средневзвешенная цена закупки инсулина и его аналогов ЛПУ РФ за 2016 год, руб.

МНН\Квартал	1 квартал	2 квартал	3 квартал	4 квартал	За год:
инсулин аспарт	1 648,96	1 697,20	1 201,35	1 229,85	1 398,59
инсулин аспарт двухфазный	1 410,52	1 532,94	1 536,88	1 469,63	1 487,49
инсулин аспарт+инсулин деглудек	5 196,09	7 980,96	7 218,11	5 461,56	6 607,41
инсулин гларгин	3 367,18	3 288,92	3 132,63	3 810,52	3 437,98
инсулин глулизин	2 467,79	1 734,03	1 708,23	1 682,21	1 996,26
инсулин двухфазный человеческий генно-инженерный	823,75	711,64	751,59	723,72	749,19
инсулин двухфазный человеческий полусинтетический	7 296,94	7 673,16	7 689,66	7 492,92	7 538,17
инсулин деглудек	2 447,46	2 560,67	2 444,72	2 366,04	2 454,72
инсулин детемир	1 725,39	1 768,22	1 821,44	2 107,93	1 892,06
инсулин лизпро	1 559,67	1 546,50	1 375,22	1 192,59	1 463,36
инсулин лизпро двухфазный	754,22	727,47	718,64	665,55	716,24
инсулин растворимый человеческий генно-инженерный	745,22	729,59	657,24	629,40	688,98
инсулина-цинк человеческого генно-инженерного комбинированного суспензия	634,26	525,77	571,55	576,86	573,30
Итого:	1 353,82	1 306,04	1 241,12	1 117,41	1 253,07

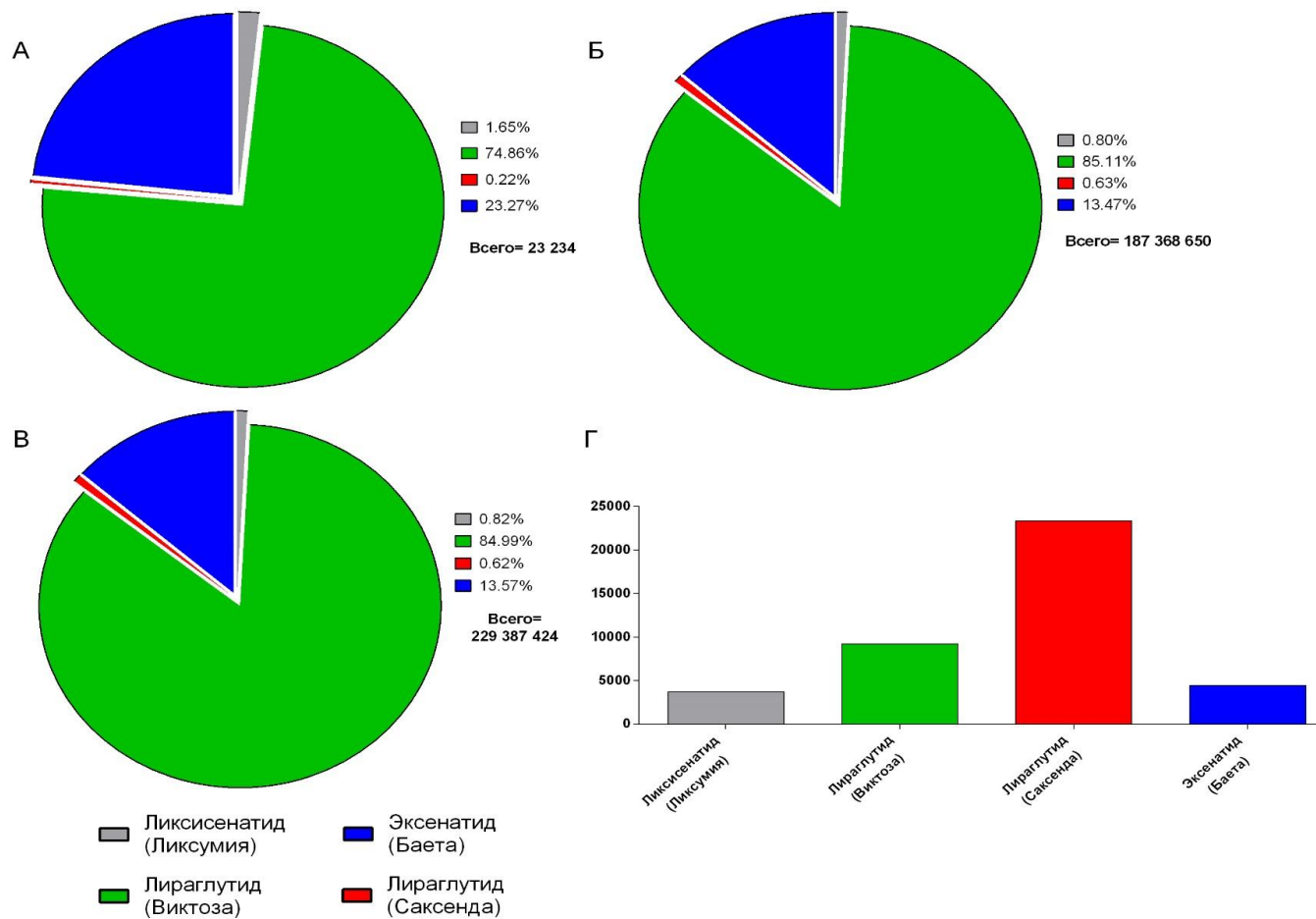
Обзор рынка гипогликемических лекарственных средств, сумма продаж гипогликемических ЛС в упаковках (А), рублях в аптеки (Б), рублях из аптеки (В) и средняя цена закупки ЛС в аптеку (Г) Примечание: под метформинном подразумеваются препараты, содержащие только метформин, включая его пролонгированную форму.



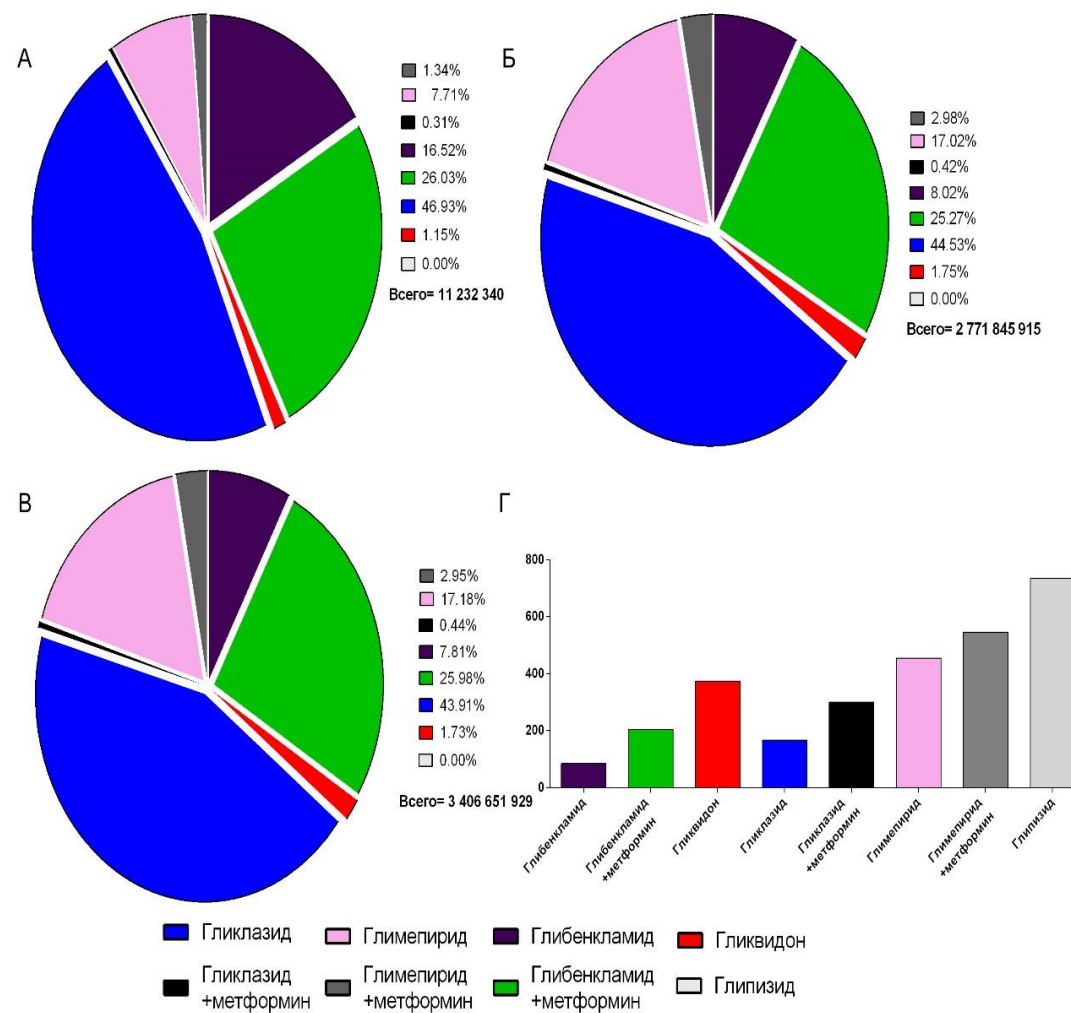
Обзор рынка ингибиторов ДПП-4, сумма продаж в упаковках (А), рублях в аптеки (Б), рублях из аптеки (В) и средняя цена закупки ЛС в аптеку (Г)



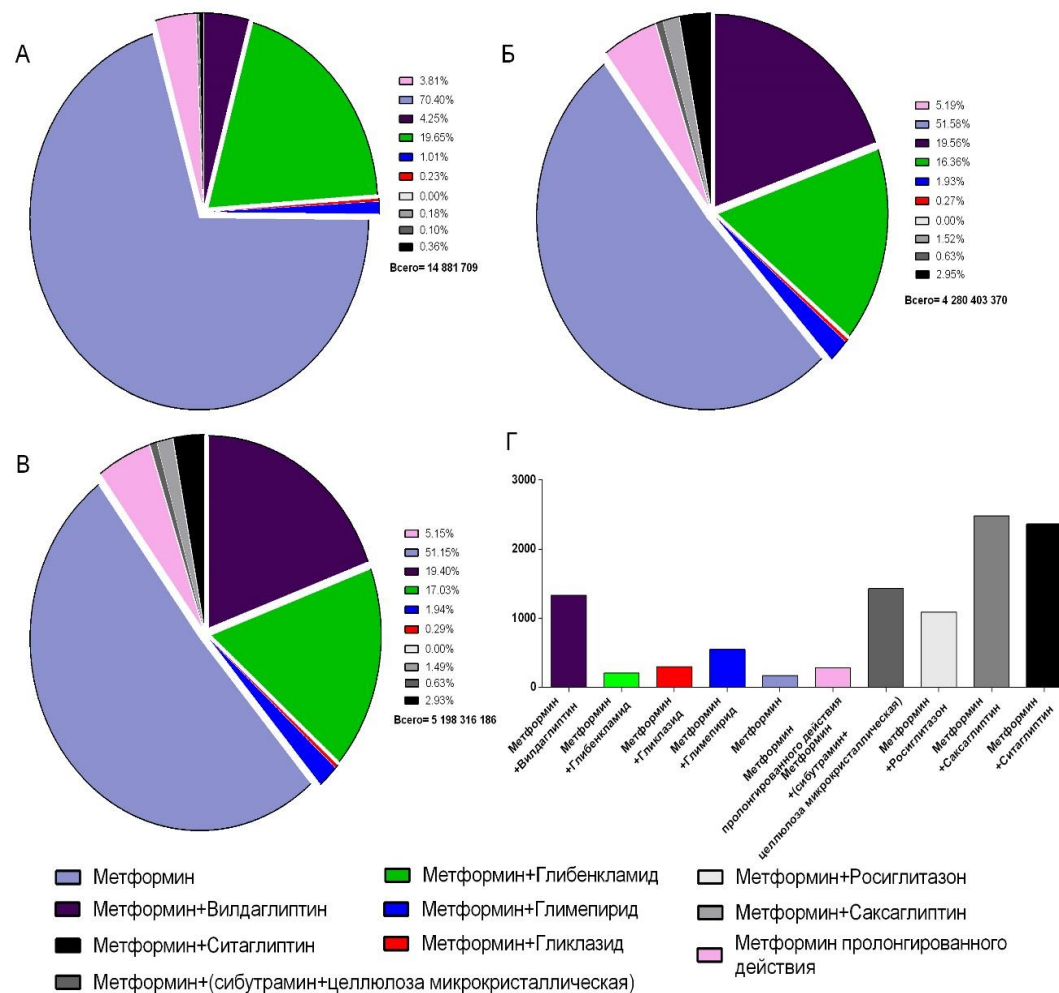
Обзор рынка агонистов ГПП-1, сумма продаж в упаковках (А), рублях в аптеки (Б), рублях из аптеки (В) и средняя цена закупки ЛС в аптеку (Г)



Обзор рынка производных сульфонилмочевины, сумма продаж в упаковках (А), рублях в аптеки (Б), рублях из аптеки (В) и средняя цена закупки ЛС в аптеку (Г)



Обзор рынка препаратов, содержащих метформин, сумма продаж в упаковках (А), рублях в аптеки (Б), рублях из аптеки (В) и средняя цена закупки ЛС в аптеку (Г)



Обзор рынка гипогликемических средств, сумма продаж в упаковках (А), рублях в ЛПУ (Б) и средняя цена закупки ЛС (В)

