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

На правах рукописи

ЛОГВИНОВА ЕКАТЕРИНА ОЛЕГОВНА

КОГНИТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ У КРЫС С НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ И ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИЕЙ, ИХ КОРРЕКЦИЯ НОВЫМ АГОНИСТОМ GPR119

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор Тюренков Иван Николаевич

ВОЛГОГРАД, 2018

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Патогенез снижения интеллектуальных функций при СД	12
1.1.1. Влияние гипергликемии на нарушение когнитивных функций	13
1.1.2. Влияние гипогликемии на снижение интеллекта	15
1.1.3. Влияние инсулинорезистентности на ухудшение познавательных	
функций	18
1.1.4. Эндотелиальная дисфункция в развитии когнитивных нарушений пр	ЭИ
СД 21	
1.2. Атеросклероз и его влияние на ухудшение познавательных функций	24
1.3. Хроническое нарушение мозгового кровообращения и когнитивный	
дефицит	28
1.4. Фармакотерапия когнитивных нарушений при ХНМК на фоне СД	29
1.5. Возможности инкретинопосредованной терапии нарушений	
познавательных функций у пациентов с СД	31
1.6. Обзор групп ЛП с инкретиновой активностью	33
1.6.1. Агонисты ГПП-1	33
1.6.2. Ингибиторы ДПП-4	35
1.6.3. Агонисты GPR119	36
1.6.4. Соединение ZB-16 в качестве перспективного агониста GPR119	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	
2.1. Экспериментальные животные	41
2.2. Исследуемое соединение и препараты сравнения	42
2.3. Дизайн исследования	43
2.4. Моделирование хронической недостаточности мозгового	
кровообращения	46
2.4.1. Модели стенозирования общих сонных артерий	46
2.4.2. Выполнение процедуры частичного стенозирования общих сонных	
артерий	47
2.5 Моделирование никотинамил-стрептозотоцин-индуцированного	

сахарного диабета	49
2.6. Определение уровня глюкозы крови	49
2.7. Оценка когнитивного дефицита	50
2.7.1. Тесты «Условная реакция пассивного избегания» (УРПИ) и тест	
«экстраполяционного избавления» (ТЭИ)	50
2.7.2. Оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активно-	сти
в тесте «Открытое поле»	51
2.7.3. Оценка тактильной чувствительности и мелкой моторики при	
проведении адгезивного теста	52
2.7.4. Тест закапывания стеклянных шариков	52
2.7.5. Оценка обучаемости и рабочей памяти крыс в Т-и Ү-образных	
лабиринтах	53
2.7.6. Оценка обучаемости и кратковременной пространственной памяти в	3
лабиринте Барнс	55
2.7.7. Оценка физической работоспособности животных в тесте	
принудительного плавания с грузом	55
2.7.8. Оценка нарушений координации движений в тесте удержания на	
вращающемся стержне	56
2.8. Оценка вазодилатирующей функции эндотелия	56
2.9. Морфометрическое исследование головного мозга	57
2.10. Статистическая обработка результатов исследования	57
ГЛАВА 3. КОГНИТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ, ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРИ	
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОГО	
НАРУШЕНИЯ МК НА ФОНЕ НИКОТИНАМИД-СТРЕПТОЗОТОЦИН-	
ИНДУЦИРОВАННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА	59
3.1. Оценка уровня гликемии у животных с хроническим нарушением	
мозгового кровообращения и экспериментальным сахарным диабетом	60
3.2. Оценка когнитивного дефицита в тестах УРПИ и ТЭИ	61
3.3. Оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активност	ти в
тесте Открытое поле.	63

3.4. Оценка тактильной чувствительности и мелкой моторики в адгезивном
тесте
3.5. Оценка защитного поведения в тесте "закапывание стеклянных шариков"
3.6. Оценка моторного дефицита в тестах Ротарод и принудительное
плавание
3.7. Оценка обучаемости и рабочей памяти в Т- и Y-образных лабиринтах 68
3.8. Оценка обучаемости и кратковременной пространственной памяти в
лабиринте Барнс
Заключение74
ГЛАВА 4. КОРРЕКЦИЯ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ У КРЫС С
ХРОНИЧЕСКОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ МОЗГОВОГО
КРОВООБРАЩЕНИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ
ДИАБЕТОМ НОВЫМ АГОНИСТОМ GPR119 И ЕГО КОМБИНАЦИЯМИ. 76
4.1. Оценка влияния соединения ZB-16 на уровень гликемии у животных с
хроническим нарушением мозгового кровообращения и экспериментальным
сахарным диабетом
4.2. Коррекция когнитивных нарушений у крыс с хроническим нарушением
мозгового кровообращения и экспериментальным сахарным диабетом
соединением ZB-16, метформином, ситаглиптином и их комбинациями 81
4.2.1. Оценка когнитивного дефицита в тестах ТЭИ и УРПИ
4.2.2. Оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активности
в тесте «Открытое поле»
4.2.3. Оценка моторного дефицита в тестах Ротарод и принудительное
плавание с грузом
4.2.4. Оценка тактильной чувствительности и мелкой моторики в адгезивном
тесте
4.2.5. Оценка поведения животных в тесте закапывания стеклянных шариков
89
4 2.6. Оценка обучаемости и рабочей памяти в Т-и У-образных пабиринтах. 90

4.2.7. Оценка обучаемости и кратковременной пространственной памя	яти в
лабиринте Барнс	97
Заключение	98
ГЛАВА 5. МЕХАНИЗМ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ	
СОЕДИНЕНИЯ ZB-16 ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ НАРУШЕНИИ МОЗГО	ОВОГО
КРОВООБРАЩЕНИЯ НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАІ	РНОГО
ДИАБЕТА	101
5.1. Оценка влияния соединения ZB-16 на кровоток в общих сонных а	ртериях
и в проекции средней мозговой артерии у животных с хроническим	
нарушением мозгового кровообращения и экспериментальным сахарн	IЫМ
диабетом	101
5.2. Оценка влияния соединения ZB-16 на вазодилатирующую функци	1Ю
эндотелия животных с хроническим нарушением мозгового кровообр	ащения
и экспериментальным сахарным диабетом	104
5.3. Оценка влияния соединения ZB-16 на плотность нейронов и сосуд	дов
микроциркуляторного русла головного мозга крыс с хроническим	
нарушением мозгового кровообращения и экспериментальным сахарн	IЫМ
диабетом	106
ГЛАВА 6. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	110
ВЫВОДЫ	121
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	123
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	124
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	125
СПИСОК ПИТЕРАТУРЫ	128

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

По данным Международной диабетической федерации (IDF) в 2017 году количество пациентов с сахарным диабетом во всем мире составляет 424.9 млн. В России официально по данным Федерального регистра сахарным диабетом страдает 3%, а реально - более 6% населения (8,5 млн) [Дедов И. И., 2017б]. Заболеваемость сахарным диабетом во всем мире является огромной проблемой общественного здравоохранения и носит характер пандемии.

Впервые о снижении интеллектуальных функций у больных СД сообщили в 1922 году W.Miles и H.Root [Miles W., 1922]. Авторы объективно показали снижение (на 15 процентов и более) памяти и внимания у пациентов с СД. Лечение диабета улучшало данные показатели, однако не в полной мере.

В настоящее время нейропсихологическое тестирование у пациентов с СД выявляет более серьезные нарушения когнитивных функций, и они снижаются быстрее по сравнению со здоровыми лицами того же возраста, при проспективном наблюдении [Мохорт Е. Г., 2014; Левин О. С., 2015; Feinkohl I., 2015]. Почти у половины пациентов с СД 2 типа обнаруживаются отклонения от возрастной нормы, ухудшающие их качество жизни, однако в большинстве случаев когнитивные нарушения остаются легкими или умеренными [Мохорт Е. Г., 2014; Левин О. С., 2015]. По результатам метанализа 14 исследований с участием более 2 млн пациентов при сахарном диабете риск развития деменции повышается на 60%, причем риск развития сосудистой деменции увеличивается в 2–2,6 раза, а риск развития болезни Альцгеймера (БА) – в 1,5 раза, независимо от времени манифестации СД [Левин О. С., 2012; Мохорт Е. Г., 2014; Chatterjee S., 2016].

Установлено, что лечение СД может тормозить развитие когнитивных нарушений [Левин О. С., 2015; Wang F., 2017]. В последнее время все большее внимание исследователей привлекают гипогликемические

препараты, которые не только снижали бы уровень глюкозы крови, но и обладали бы плейотропным действием, в частности, улучшали бы когнитивные функции у пациентов с СД 2 типа. Нейропротективный эффект лекарственных средств, влияющих на систему инкретинов (агонистов ГПП-1 и ингибиторов ДПП-4), в настоящее время находится в центре исследований и разработок.

Степень научной разработанности проблемы

В группе препаратов, обладающих инкретиномиметическим действием, выделяют аналоги ГПП-1, имитирующие действие глюкагонподобного пептида-1, и ингибиторы ДПП-4, пролонгирующие действие эндогенного ГПП-1. Агонисты GPR119, стимулирующие выработку инкретинов и инсулина, улучшающие восстановление β-клеток поджелудочной железы, находятся на различных стадиях доклинических и клинических испытаний. В исследованиях на животных доказаны нейропротекторные свойства агонистов ГПП-1 и ингибиторов ДПП-4, в том числе на нейродегенеративных моделях [Коsaraju J., 2013а; Kosaraju J., 2015; Athauda D., 2016; Kosaraju J., 2017].

Целью данного исследования является экспериментальное обоснование применения нового оригинального агониста GPR119 при когнитивных нарушениях, связанных с хронической гипергликемией и нарушением мозгового кровообращения.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи исследования:

- 1. Изучить влияние 4 недельного введения агониста GPR119 на поведение животных, выраженность когнитивного дефицита при хронической ишемии головного мозга и воспроизведенного на её фоне никотинамид-стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета.
- 2. Изучить влияние терапевтического введения агониста рецептора GPR119 на сенсорно-моторную чувствительность и психоэмоциональное состояние животных с хроническим нарушением мозгового кровообращения

и гипергликемией.

- 3. Изучить влияние терапевтического введения агониста рецептора GPR119 на уровень глюкозы в крови и скорость ее утилизации при проведении перорального глюкозотолерантного теста на 14 и 28 дни после начала лечения.
- 4. Изучить влияние агониста рецептора GPR119 на мозговой кровоток и вазодилатирующую функцию эндотелия у животных с хронической ишемией головного мозга и гипергликемией.
- 5. Изучить влияние агониста рецептора GPR119 на морфологические изменения в различных структурах головного мозга животных с когнитивными, психоэмоциональными и сенсорно-моторными нарушениями, обусловленными хроническим нарушением мозгового кровообращения и гипергликемией.

Научная новизна работы

выполнено исследование нейропротекторного действия агониста GPR119 хроническом нарушении нового при мозгового кровообращения и экспериментальном СД, изучено его влияние на психоэмоциональное поведение, сенсорно-моторные функции, когнитивный дефицит, а также на мозговой кровоток, вазодилатирующую функцию эндотелия и морфологические изменения в тканях головного мозга животных с ХНМК и СД.

Научно-практическая значимость и реализация результатов работы

Полученные данные о возможности коррекции когнитивных, психоэмоциональных, сенсорно-моторных нарушений, вызванных хронической недостаточностью мозгового кровообращения и длительной гипергликемией, подтверждают важность разработки на основе данного соединения гипогликемического средства для терапии сахарного диабета 2 типа с дополнительными нейропротекторными свойствами. Результаты исследования используются в научной работе и учебном процессе на

кафедрах фармакологии и биоинформатики, фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей ВолГМУ, в лаборатории метаботропных лекарственных средств и фармакологии сердечно-сосудистых средств Научного Центра инновационных лекарственных средств при ВолгГМУ.

Методология и методы диссертационного исследования

Данное исследование было выполнено с учетом рекомендаций по доклиническому изучению пероральных лекарственных средств для лечения сахарного диабета [Спасов А. А., 2012], а также с учетом литературных данных, касающихся нейропротективных свойств инкретиномиметиков [Власов Т. Д., 2016; Тюренков И. Н., 20176]. Дизайн исследования соответствовал целям, задачам, этическим правилам работы с лабораторными животными. При планировании эксперимента использовались опыт и рекомендации отечественных и зарубежных авторов. Все исследования выполнены с использованием современного оборудования, методов, отвечающих цели и задачам диссертационной работы.

Положения, выносимые на защиту

- 1. Агонист GPR119 соединение ZB-16 оказывает нейропротекторное действие при хроническом нарушении мозгового кровообращения и никотинамид-стрептозотацин-индуцированном сахарном диабете, снижая психоневрологический дефицит, выраженность сенсорномоторных нарушений, улучшает память и обучаемость крыс.
- 2. Курсовое пероральное введение соединения ZB-16 в течение 40 дней улучшает кровоток в общих сонных артериях и в проекции среднемозговой артерии, улучшает эндотелийзависимую вазодилатацию, снижает выраженность морфологических нарушений структур головного мозга у животных с экспериментальным СД и хроническим нарушением мозгового кровообращения по сравнению с контрольной группой

Личный вклад автора

Автор провел анализ литературных данных, касающихся темы диссертации, участвовал в разработке плана и протоколов исследования, в формулировании цели и задач, проведении экспериментов, обработке и описании полученных данных.

Степень достоверности и апробации результатов

В данной работе использовались современные методы исследования и высокотехнологическое оборудование, анализ результатов эксперимента обеспечении проводился на программном последнего поколения с использованием различных методов статистики в зависимости от характера Основные материалы работы были представлены Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области в направлении «Актуальные проблемы экспериментальной медицины», на 75 76 открытой научно-практической конференции молодых учёных и студентов международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2017, 2018). По результатам диссертационного исследования опубликовано 3 печатных работы в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава 1), материалов и методов (глава 2), экспериментальной части, изложенной в 3-х главах (3, 4, 5), обсуждения результатов (глава 6), выводов и списка используемой литературы, содержащего 211 источников, из них 100 российских и 111 зарубежных. Диссертация изложена на 154 страницах машинописного текста, содержит таблиц – 5, рисунков – 27.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Развитие когнитивных нарушений при СД может быть показателем неадекватной терапии и снижать приверженность лечению у таких пациентов. Формируется «порочный круг»: манифестация СД вынуждает пациента качественно изменить привычный образ жизни, включив в него ограничения в диете и увеличение физической активности [Матвеева М. В., 2016; Sebire S. J., 2018].

Однако большинство людей с СД не в полной мере осознают серьезность этого заболевания. При сахарном диабете часто отсутствует субъективная симптоматика, осложнения протекают длительно бессимптомно, и поэтому пациенты испытывают особые трудности в принятии диагноза и следовании рекомендациям врача [Старостина Е. Г., 2015б]. Так, в исследовании, проведенном Кирщиной И. А., около 80% больных СД имели низкую комплаентность, при этом наиболее значимой причиной невысокой приверженности лечению респондентов была забывчивость: более 70% респондентов отвечали, что иногда забывают принять лекарство, а также невнимательно относятся к часам приема ЛП [Кирщина И. А., 2013]. В результате неконтролируемый СД приводит к развитию раннему острых И хронических нарушений мозгового кровообращения и усугубляет когнитивные расстройства, а нарушение интеллектуальных функций, памяти и внимания у пациентов с СД 2 типа ведет в свою очередь к неадекватной терапии заболевания и нарушает его течение [Матвеева М. В., 2016]. О вкладе познавательной сферы в развитие СД свидетельствует и тот факт, что пациенты с высоким уровнем IQ достигают значимо лучшего контроля гликемии [Старостина Е. Г., 2015а]. Кроме того, наличие и выраженность инсулинорезистентности у больных с СД 2 типа существенно ухудшает качество жизни по шкалам жизненной активности, ролевого функционирования, общего состояния [Белякова Н. А., 2013]. Постепенно формируется «диабетический тип личности»: общий сниженный фон настроения, апатия, эмоциональная лабильность, частые невротические реакции, раздражительность, неспособность принять самостоятельное решение, астеническое состояние [Сидоров П. И., 2015].

1.1. Патогенез снижения интеллектуальных функций при СД

Механизм возникновения и течения нарушения когнитивных функций у пациентов с СД во многом остается неясным [Есин Р. Г., 2013; Мохорт Е. Г., 2014; Левин О. С., 2015]. Хотя когнитивные нарушения различной степени выраженности связаны с гипергликемией и длительностью СД [Гацких И. В., 2015; Cui X., 2014; Umegaki H., 2017], некоторые авторы сообщают, что снижение интеллекта нередко начинается почти в дебюте заболевания [Матвеева M. В., 2016]. При успешном контроле гипергликемии выраженность когнитивных нарушений может уменьшаться [Wang F., 2017]. Ряд исследований доказывают связь уровня гликированного гемоглобина (HbA1c) и глюкозы в крови со снижением когнитивных функций у пациентов с СД [Шведкова Т. А., 2015; Bolo N. R., 2015; Feinkohl I., 2015; Zhang D. A., 2018], в том числе отмечена связь повышенного уровня HbA1c и снижения показателей когнитивного тестирования по оценочным шкалам [Мохорт Е. Г., 2014; Гацких И. В., 2017], а также ухудшения памяти и исполнительных функций [Bolo N. R., 2015]. Однако, по сообщению некоторых авторов, строгий гликемический контроль не улучшает когнитивные функции у пациентов с СД 2 типа [Cui X., 2014; Raffield L. M., 2016].

Тем не менее, несмотря на то, что причины ухудшения когнитивных функций на фоне СД пока малопонятны и трактовка их неоднозначна, можно выделить несколько точек зрения и объяснения причин, обуславливающих нарушение памяти и внимания у пациентов с СД 2 типа.

1.1.1. Влияние гипергликемии на нарушение когнитивных функций

Хроническая гипергликемия является основной патогенетической причиной нарушения когнитивных функций при сахарном диабете и способствует развитию сосудистых осложнений и гипоксии тканей [Шведкова Т. А., 2015]. Быстрый подъем уровня глюкозы (в том числе после приема пищи) у таких пациентов вызывает снижение внимания и других нейродинамических функций [Левин О.С., 2015], причем повышение уровня глюкозы в плазме даже в пределах нормы может привести к снижению функций головного мозга [Моrtby М. Е., 2013].

Гипергликемия воздействует на ткани посредством следующих механизмов:

- 1. Увеличенный ток глюкозы через полиоловый путь и накопление сорбитола и фруктозы, которые приводят к нарушению осмотического и электролитного баланса, отеку, нарушению структуры и функции клетки, то есть оказывают на них токсическое действие. В результате снижается уровень миоинозитола и уменьшается активность № № нарушению сфатазы, снижается выработка АТФ с дальнейшим развитием «энергетического дефицита». В результате происходит распад белков и образование аммиака, который приводит к повреждению и демиелиназации нервной ткани [Величко П. Б., 2014; Галстян Г. Р., 2014; Белова А. Н., 2016].
- 2. Повышенное формирование конечных продуктов гликирования (Advanced Glycation end products, AGE), которые усугубляют оксидативный стресс и способствуют увеличению уровня провоспалительных (ИЛ-1, ИЛ-8, ФНО-α) и просклеротических (ИЛ-6, МСР-1, ТGF-β) цитокинов [Черников А. А., 2017; Volpe C. M. O., 2018]. АGE-продукты, накапливаясь у больных СД, усиливают экспрессию медиаторов сосудистого повреждения, высвобождение которых также стимулируется повышенным уровнем глюкозы крови [Галстян Г. Р., 2014]. Кроме того, конечные продукты

гликирования снижают эластичность стенки сосудов, вызывают диффузное утолщение интимы, дисфункцию эндотелия и ускоряют накопление в интерстиции коллагена, что в совокупности приводит к нарушению кровоснабжения различных органов и тканей [Грачева С. А., 2012; Иванникова Е. В., 2014] и снижению гемоперфузии головного мозга.

- 3. Повышение экспрессии рецепторов к конечным продуктам усиленного гликирования и их активирующих лигандов [Черников А. А., 2017].
- 4. Активация протеинкиназы С. Блокада гликолиза на стадии образование α-глицеролфосфата триозофосфатов повышает предшественника диацилглицерола, повышающего активность протеинкиназы С. Она в свою очередь ответственна за активизацию транскрипционного ядерного фактора «каппа-би» (nuclear factor кВ, NF-кВ), способствующего повышению адгезии моноцитов к сосудистой стенке и их дифференцировке макрофаги cпоследующей провоспалительной модификацией, также избыточной экспрессии провоспалительных биомаркеров и простагландинов [Грачева С. А., 2012; Мирзоева Л. А., 2014; Капустин Р. В., 2017; Volpe С. М. О., 2018].
- 5. Повышенная активность гексозаминового пути. Конечным продуктом гексозаминового ПУТИ является уридин-фосфат-Nацетилглюкозамин, который участвует в гликозилировании белков нарушении функции нервов, в том числе способствует денервации и демиелинизации нервных волокон. [Шавловская О. А., 2014; Шурдумова М. Г., 2015; Белова А. Н., 2016].

Все вышеуказанные механизмы в конечном итоге активируют окислительный стресс [Чак Т. А., 2015; Черников А. А., 2017]. В результате перекисного окисления липидов вырабатывается значительное количество свободных радикалов, которые стимулируют повышенный синтез провоспалительных цитокинов [Газизова Г. Р., 2013; Литвиненко Е. А., 2014]. ФНО-а и ИЛ-6 нарушают синтез и работу инсулиновых рецепторов и

внутриклеточного транспортера глюкозы в мышцах, жировой ткани, печени, угнетают секрецию инсулина, вызывают апоптоз β-клеток островков Лангерганса поджелудочной железы [Кондратьева Л. В., 2014], что способствует развитию и прогрессированию осложнений СД.

Имеются также сведения о том, что, в условиях гипергликемии увеличивается концентрация основного фактора роста фибробластов (basic fibroblast growth factor, β-FGF), тромбоцитарного фактора роста (platelet derived growth factor, PDGF AA) и трансформирующего фактора роста (transforming growth factor, TGFβ1) [Иванникова Е. В., 2014]. Прямая активация фибробластов в условиях гипергликемии приводит к разрушению коллагена и перестройке стенки сосудов с развитием фиброза [Иванникова Е. В., 2014], что нарушает мозговое кровообращение, вызывает поражение миокарда, печени, легких и других жизненно важных органов.

Помимо этого, гипергликемия и колебания уровней глюкозы крови усиливают фосфорилирование т-белка, что приводит к накоплению нейрофибриллярных клубков в нейронах (патологических олигомеров), которые вызывают дегенерацию и гибель нервных клеток, ответственных за память и когнитивные функции [Татарникова О. Г., 2015; Матвеева М. В., 2017].

1.1.2. Влияние гипогликемии на снижение интеллекта

Несмотря на то, что гипогликемией считается уровень глюкозы плазмы менее 2,8-2,2 ммоль/л (в зависимости от наличия или отсутствия клинических симптомов), купирование этого состояния у больных СД необходимо уже при уровне глюкозы менее 3,9 ммоль/л [Дедов И. И., 2017а]. Эпизоды гипогликемии наиболее часто возникают при использовании препаратов сульфонилмочевины, глинидов и инсулина и составляют примерно 35—70 эпизодов на 100 человеко-лет [Шестакова М. В., 2013], тяжелых гипогликемий (для выведения из которых требуется помощь другого

человека) у больных СД 2 типа – до 0,2 случая на одного больного в год [Старостина Е. Г., 2013].

Выделяют следующие факторы, провоцирующие гипогликемию у пациентов с СД [Погорелова А. С., 2016]:

- 1. непосредственно связанные с медикаментозной сахароснижающей терапией:
- 1.1. передозировка препарата вследствие ошибки больного или врача (слишком низкий целевой уровень гликемии либо слишком высокие дозы);
- 1.2. изменение фармакокинетики инсулина или пероральных гипогликемических средств из-за смены препарата, развития почечной или печеночной недостаточности у пациента, высокого титра антител к инсулину, неправильной техники инъекций или лекарственного взаимодействия препаратов;
- 1.3. прием β-адреноблокаторов: блокада β1-адренорецепторов в печени усиливает гликогенез, а блокада β2- адренорецепторов клеток островкового аппарата поджелудочной железы угнетает выброс инсулина [Зборовский А. Б., 2008; Кукес В. Г., 2015];
- 2. связанные с питанием: пропуск приема пищи или недостаточное количество углеводов; прием алкоголя; ограничение питания для снижения массы тела без соответствующего уменьшения дозы сахароснижающих препаратов;
- 3. повышение чувствительности к инсулину: например, при длительной физической нагрузке [Мельникова О. Г., 2010].

Результатом гормонального ответа на гипогликемию является снижение интенсивности утилизации глюкозы в тканях и повышение уровня глюкозы крови вследствие процессов глюконеогенеза и гликогенолиза в печени. У больных СД постепенно уменьшается способность увеличивать секрецию глюкагона в ответ на снижение гликемии, и активация симпатической нервной системы становится единственной возможностью восстановить нормальный уровень глюкозы в крови [Патракеева Е. М., 2016]. Усиление

симпатических влияний на сердце, высвобождение катехоламинов приводит к повышению артериального давления, провоцирует изменение процессов реполяризации в миокарде, индуцирует аритмии [Шурдумова М. Г., 2015], может привести к ухудшению кровоснабжения миокарда [Лаптев Д. Н., 2012], что на фоне имеющихся сердечно-сосудистых нарушений вызывает ишемические повреждения.

Однако у пациентов с СД реакция катехоламинов на гипогликемию снижена вследствие изменения порогового значения концентрации глюкозы крови, при котором происходит контррегуляторная активация секреции адреналина и норадреналина. На степень недостаточности адреналинового ответа при гипогликемии влияют такие показатели, как длительность течения СД, качество контроля уровня гликемии, скорость снижения уровня глюкозы В крови. результате y таких пациентов снижается возможность распознавания умеренной гипогликемии повышается даже И риск возникновения тяжелой гипогликемии [Лаптев Д. Н., 2014; Патракеева Е. М., 2016].

Острое снижение уровня глюкозы крови может снижать регионарную перфузию мозга и нарушать осмотическое равновесие в церебральных O.C., 2015], воздействовать нейронах [Левин на метаболизм нейротрансмиттеров, а также на взаимодействие и функционирование клеток головного мозга даже у здоровых людей, что проявляется изменением функциональных связей (functional connectivity, FC) областей мозга, активных в состоянии покоя (resting state network, RSN) [Bolo N. R., 2015]. Неблагоприятное действие гипогликемии также может быть связано с гибелью нейронов, особенно в нескольких наиболее уязвимых зонах мозга, таких как гиппокамп, а также активацией свертывающих систем крови (за счет повышения агрегации тромбоцитов и формирования фибриногена) и ишемии [Мохорт Е. Г., 2014; Левин О.С., 2015]. Повреждающее действие гипогликемии преимущественно сказывается на пожилых пациентах, которые более низкой пластичности в меньшей степени способны

нивелировать последствия повреждения. У этой группы больных тяжелые эпизоды гипогликемии являются независимым фактором риска нарушения когнитивных функций и деменции [Погорелова А. С., 2016; Simó R., 2017].

1.1.3. Влияние инсулинорезистентности на ухудшение познавательных функций

В головной мозг глюкоза доставляется посредством транспортеров (GLUT1, GLUT2, GLUT3), в функционировании которых инсулин не участвует. Тем не менее он играет существенную роль в регуляции захвата глюкозы клетками головного мозга: астроциты увеличивают захват глюкозы при действии инсулина, эндотелиоциты ГЭБ экспрессируют рецепторы инсулина, и, в свою очередь, астроциты регулируют экспрессию GLUT1 на эндотелиоцитах [Салмина А. Б., 2013].

На ранних стадиях СД 2 типа поджелудочная железа вырабатывает больше инсулина, чем у здоровых людей, что приводит к состоянию гиперинсулинемии и развитию инсулинорезистентности; однако утилизация глюкозы в печени в это время остается нормальной, с эугликемией натощак и постпрандиальной гипергликемией в пределах стандартных значений. На более заболевания продолжает поздних стадиях развиваться инсулинорезистентность, растет продукция глюкозы в печени, тогда как эндогенная продукция инсулина падает, в результате чего наблюдается гипергликемия натощак и особенно после еды. Повышение уровня инсулина на периферии резко повышает уровень инсулина в головном мозге и спинномозговой жидкости, а длительная периферическая гиперинсулинемия снижает транспорт инсулина через ГЭБ путем подавления активности инсулиновых рецепторов, что и вызывает развитие инсулинорезистентности в головном мозге [Tramutola A., 2017].

Нарушение передачи сигналов инсулина снижает утилизацию глюкозы тканями и может играть ключевую роль в ухудшении когнитивных функций при СД 2 типа. Об этом говорит то, что структурные повреждения головного обнаруживаются V больных cинсулинорезистентностью без выявленного сахарного диабета [Biessels G. J., 2015]. Инсулин способен через ГЭБ и оказывать дифференцированное влияние на проникать Введение познавательную деятельность. инсулина может улучшать интеллектуальные функции вследствие непосредственного действия на инсулиновые рецепторы, которые находятся на нейронах и астроцитах в коре головного мозга и лимбической системе [Guo Z., 2017]. Кроме того, интраназальное введение простого или пролонгированного инсулина улучшало рабочую память как в исследованиях на животных, так и на людях, и повышало церебральный метаболизм глюкозы [Hölscher C., 2014; Brabazon F., 2017; Guo Z., 2017].

Однако в противовес этому, постоянный повышенный уровень инсулина в крови может вызывать и совершенно противоположный эффект, проявляющийся ухудшением познавательных функций и увеличением риска микрососудистых осложнений и болезни Альцгеймера [Левин О.С., 2015] за счет изменения метаболизма β-амилоида [Боголепова A. H., 2015; Tsai C-K., 2016]. Церебральный клиренс β-амилоида происходит через микроглиальный захват, опосредованный рецепторами к липопротеину низкой плотности, или протеолитическую деградацию, которая обеспечивается инсулиндеградирующим ферментом, имеющим более высокое сродство к инсулину, по сравнению с β-амилоидом. В результате инсулин, конкурируя с В-амилоидом, увеличивает его уровень в головном мозге. Дегенеративный процесс могут вызывать, помимо гиперинсулинемии, и другие нарушения обмена веществ, в том числе гиперлипидемия или ожирение [Feinkohl I., 2015; Tsai C-K., 2016], а также повышенный уровень глюкозы, вызывающий гликирование В-амилоида, что усиливает его агрегацию. Гиперинсулинемия, особенно у пациентов с абдоминальным ожирением, может вызывать повышение продукции провоспалительных цитокинов [Сосина В. Б., 2017], что усиливает дегенеративный процесс.

Однако уже возникшая болезнь Альцгеймера у пациентов с СД 2 типа может развиваться медленнее, чем у лиц без диабета [Левин О. С., 2015]. Так, у пациентов с СД и деменцией обнаружена более низкая степень отложения β-амилоида в паренхиме мозга и церебральных кровеносных сосудах по сравнению с пациентами с деменцией, но не без диабета [Sonnen J. A., 2009]. В другом исследовании зависимость риска деменции от уровня глюкозы в крови 7,8-11,0 ммоль/л («пограничный диабет») не была статистически значимой, в отличие от неконтролируемого СД (≥11,0 ммоль/л) [Xu, W. L., 2009 Возможно, что при относительной недостаточности островковых клеток поджелудочной железы понижается уровень инсулина, и разрушение В-амилоида может ускоряться. Также предполагается, что отрицательное действие может оказывать не просто повышенный уровень инсулина в крови, а связанные с ним нарушения обмена веществ. Сам же инсулин, воздействуя на рецепторы инсулиноподобного фактора роста 1 $(И\Phi P-1),$ поддерживать трофику нейронов и препятствовать развитию дегенеративного процесса [Макишева Р. Т., 2016].

Выдвигается гипотеза о том, что инсулинорезистентность нейронов периферической головного мозга тэжом привести развитию К инсулинорезистентности. В некоторых отделах мозга, в том числе в гипоталамусе и гиппокампе, присутствует как высокая концентрация инсулина (по сравнению с периферическими тканями), так и большая плотность рецепторов к инсулину и к инсулиноподобному фактору роста [Blázquez E., 2014]. Нейроны и астроциты могут вырабатывать инсулин как сами по себе (о чем говорит присутствие в этих клетках мРНК инсулина), так и получать его через ГЭБ посредством специального переносчика. При этом белок-переносчик глюкозы в нейронах и астроцитах нечувствителен к концентрации инсулина, в связи с чем головной мозг обоснованно считается органом, нечувствительным к инсулину,

Таким образом, развивающаяся центральная инсулинорезистентность может способствовать возникновению нарушения поглощения глюкозы

периферическими тканями, то есть привести К периферической инсулинорезистентности, и инициировать нейродегенеративный процесс при БΑ, проявляющийся накоплением фибриллярного β-амилоида, внутриклеточных фибрилл т-белка и апоптозом, Тем не менее центральная инсулинорезистентность может не причиной являться только нейродегенеративного процесса или распространенных гипоксических изменений в нервной ткани, но и их следствием. Нейродегенерация и центральная инсулинорезистентность приводят к развитию СД 2 типа, который вызывает нарушение функций головного мозга, что усугубляет инсулинорезистентность И способствует формированию «порочного круга» [Горина Я. В., 2014]. В результате умеренный дефицит когнитивный может трансформироваться деменцию альцгеймеровского или смешанного типов и ухудшать развитие СД 2 типа.

1.1.4. Эндотелиальная дисфункция в развитии когнитивных нарушений при СД

Гипергликемия в сочетании с оксидативным стрессом вызывает активацию фактора транскрипции NF-kB, который играет решающую роль в регуляции экспрессии генов, вовлеченных В пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток, а также генов воспалительного ответа [Клаан Н. К., 2014], вызывая гиперэкспрессию циклооксигеназы (ЦОГ-2), усиленноую продукцию простагландина Е2, активацию каспазы-3 и апоптоз эндотелиоцитов [Какорин С. В., 2015]. Ведущую роль в развитии ЭД при СД играет оксид азота. При СД ухудшается эндотелий-зависимая (NOопосредованная) вазодилятация посредством следующих механизмов [Драпкина О. М., 2013]:

1. Гипергликемия блокирует активацию эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и повышает продукцию активных форм кислорода (особенно супероксид-аниона O^{2-}) в гладкомышечных клетках стенок сосудов и клетках

эндотелия, индуцирует увеличение потребления НАДФН, кофактора в продукции NO, что в совокупности снижает уровень оксида азота и его активность [Галстян Г. Р., 2014]. Избыточная генерация свободных радикалов ухудшает NO-индуцированную релаксацию в том числе через накопление конечных продуктов гликирования, циркулирующих в крови, которые также ответственны за развитие диабетических сосудистых осложнений [Галстян Г. Р., 2014].

- 2. Инсулинорезистентность, которая является независимым фактором риска развития атеросклероза [Грачева С. А., 2012], приводит к чрезмерному высвобождению свободных жирных кислот из жировой ткани, которые активируют протеинкиназу С, угнетают активность фосфатидилинозитол-3киназы, а также стимулируют выработку реактивных форм кислорода, что в совокупности нарушает продукцию оксида азота, либо снижает активность выработанных NO [Драпкина 0. M., молекул 2013]. уже Инсулинорезистентность при СД 2 типа также влияет на процесс гемостаза, нарушая процесс фибринолиза путём стимуляции синтеза ингибитора активатора плазминогена 1 типа (PAI-1), фактора VII, и изменения в генах экспрессии молекул адгезии и Р-селектина [Галстян Г. Р., 2014], снижения активности антикоагулянтов (протеин C, антитромбин III), а также за счёт повышения других прокоагулянтных факторов, фибриногена, фактора фон Виллебрандта, фактора Х. Гиперфибриногенемия, увеличение вязкости крови, повышенная склонность тромбоцитов и эритроцитов к агрегации, обусловленная недостатком NO, ухудшают микроциркуляцию, повышают риск развития тромботических сосудистых осложнений и церебральную ангиопатию [Кособян Е. П., 2012; Кошкарбаева А. К., 2013].
- 3. Гипергликемия увеличивает выработку эндотелиальными клетками провоспалительных цитокинов, которые вызывают экспрессию молекул адгезии, снижают синтез коллагена гладкомышечными клетками, что приводит к нестабильности уже существующих атеросклеротических бляшек. Кроме того, гипергликемия усиливает продукцию матриксной

металлопротеиназы, которая приводит к разрушению коллагена и вызывает ангиопатии. При уменьшении синтеза и усилении распада коллагена увеличивается вероятность разрыва бляшки, что может приводить к тромбообразованию.

4. Гипергликемия повышает синтез сосудосуживающих полипептидов, особенно эндотелина-1. Кроме своего сосудосуживающего действия, эндотелин-1 также увеличивает реабсорбцию натрия и воды в почечных канальцах, стимулирует ренин-ангиотензин-альдостероновую систему (РААС) и способствует гипертрофии гладкомышечных клеток кровеносных сосудов. [Драпкина О. М., 2013].

Таким образом, эндотелиальная дисфункция при СД, проявляющаяся в нарушении вазомоторной, тромбофлибической, адгезивной и ангиогенной функциях эндотелия [Мельникова Ю. С., 2015; Bertoluci M. C., 2015; Park K-H., 2015; Toth P., 2017], может привести к развитию атеросклероза и нарушению мозгового кровообращения [van Sloten T. T., 2017].

Существует гипотеза, эндотелиальная дисфункция что может предшествовать СД 2 типа (то есть может являться как причиной, так и следствием) [Шестакова М.В., 2004; Bertoluci M. C., 2015; van Sloten T. T., 2017], так как функциональные изменения эндотелия, как правило, предшествуют морфологическим изменениям В сосудистой стенке [Мельникова Ю. С., 2015].

Последнее время все больше внимания исследователей привлекает особый слой, покрывающий эндотелия стенки гликокаликс. Он представляет собой отрицательно заряженный, гидратированный, полисахаридный слой сетчатой структуры, толщиной 0,02 - 8,9 мкм, который покрывает клетки эндотелия. Его основными компонентами являются (мембранные растворимые) протеогликаны И И гликозаминогликаны [Максименко А. В., 2016]. Эндотелиальный гликокаликс действует как барьер между стенками сосуда и кровью, препятствует коагуляции и адгезии макромолекул, в том числе лейкоцитов, к эндотелиальной поверхности [Devuyst O., 2014]. Сообщалось, что правильное функционирование эндотелия в немалой степени зависит от состояния и экспрессии гликокаликса [Mitra R., 2017]. Этот особый слой играет роль в регуляции продукции оксида азота [Pagnozzi L. A., 2017], а его повреждение может снижать экспрессию eNOS [Mitra R., 2017]. Высказывалась гипотеза о существовании «порочного круга» между поврежденным эндотелиальным гликокаликсом и дисфункцией эндотелия [Zhang X., 2018]. Помимо этого, объем гликокаликса снижается при сахарном диабете 1 типа, а также существенно уменьшается при острой гипергликемии даже у здоровых людей [Nassimisadeh M., 2010].

1.2. Атеросклероз и его влияние на ухудшение познавательных функций

Установлено, что у больных СД риск развития атеросклероза сосудов головного мозга существенно повышен, а течение атеросклероза чаще осложняется риском инсульта [Ануфриев П. Л., 2015]. Атеросклероз при СД развивается гораздо быстрее, по сравнению со здоровыми людьми, из-за нарушения метаболизма, которые включают в себя гипергликемию, резистентность к инсулину, дислипидемию и дисфункцию эндотелия [Perales-Torres A. L., 2016].

Инсулинорезистентность И гипергликемия ускоряют атерогенез посредством индуцирования вазоконстрикции, воспаления и тромбоза нарушения микроциркуляции И инициации атероматозного сосудов, процесса, а также снижения синтеза оксида азота (NO), приводящего к нарушению эндотелий зависимой вазодилатации сосудов. Помимо этого, в условиях окислительного стресса перекисному окислению подвергаются ЛИПИДЫ фосфолипиды артериальной стенки, ЧТО сопровождается структуры физико-химических свойств, изменением ИХ И также иммунологических особенностей этих соединений. Повышенное окисление частиц ЛПНП приводит к нарушению сосудистой функции, вазоконстрикции и повышению пролиферации гладкомышечных клеток сосудистой стенки. В результате инициируются процессы гуморального иммунитета и начинается выработка специфических аутоантител. Кроме того, ЛПНП могут захватываться гладкомышечными клетками артерий, что способствует образованию атеросклеротических бляшек. Все перечисленные аспекты влияния инсулинорезистентности и гипергликемии при СД 2 типа являются составляющей частью атерогенеза [Кошкарбаева А. К., 2013].

Дислипидемия при СД 2 типа, ускоряющая развитие атеросклероза, характеризуются "липидной триадой", которая включает в себя увеличение концентрации триглицеридов, снижение уровня холестерина, липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) и преобладание в крови атерогенной фракции – липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) [Какорин С. В., 2015]. Сообщалось, метаболизма что изменения липопротеинов ΜΟΓΥΤ предшествовать возникновению нарушение толерантности к глюкозе и гипертриглицеридемии [Sanchez-Margalet V., 2014].

В 2003 году Hunt K. J. и соавторы впервые предположили, что прогрессирование атеросклероза может предшествовать манифестации диабета, так как у людей с СД 2 и преддиабетом показатель «толщина участников комплекса «интима-медиа» был намного выше, чем У исследования без нарушений углеводного обмена. Авторы также сообщали, что атеросклероз может ускорять развитие сердечно-сосудистых заболеваний еще до установления диагноза СД [Hunt K. J., 2003]. В настоящее время также предполагается, что атеросклероз может быть предиктором возникновения СД 2 типа [Bertoluci M. C., 2015; de Simone G., 2017].

При атеросклерозе возникает дискоординация тонуса сосудов головного мозга с изменением параметров ауторегуляции. Наличие СД 2 типа осложняет и ухудшает течение атеросклероза. Поражение головного мозга у таких больных приводит к нарушению когнитивных функций, которое формируется в результате поражения артерий мелкого калибра [Каменская О.

B., 2013].

На снижение интеллектуальных функций могут оказывать влияние и факторы риска, такие как артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, курение, низкая физическая активность, дислипидемия и ожирение. Вероятность возникновения когнитивных нарушений повышается при сочетании нескольких факторов риска. Так, степень поражения мелких мозговых сосудов, которая определяет выраженность снижения познавательных функций, усугубляется у пациентов с артериальной гипертензией на фоне СД [Галяви Р. А., 2014].

Цереброваскулярная или нейродегенеративная патология, развитию которых способствуют метаболические расстройства при СД, имеют наиболее важное значение в усугублении снижения когнитивных функций [Левин О. С., 2015]. Сосудистая мозговая недостаточность, и как следствие хроническое нарушение мозгового кровообращения (ХНМК), является одним из характерных проявлений СД 2 типа, развивается совместно с нарушениями углеводного обмена (хотя вопрос о первичности этих патологий остается открытым [Жармухамбетова Л. Т., 2012]), и может являться основой нарушения когнитивных функций [Мироненко М. О., 2013].

цереброваскулярная возникновении деменции патология И дегенеративные механизмы могут взаимодействовать между собой. Общим звеном между нейродегенерацией и сосудистыми нарушениями является воспалительный процесс, вызывает повышенную продукцию провоспалительных цитокинов в головном мозге и активацию микроглии [Левин О. С., 2015]. Таким образом, главной причиной развития деменции у пациентов с СД 2 типа, очевидно, является микроангиопатия церебральных сосудов, приводящая к ХНМК (рис.1).

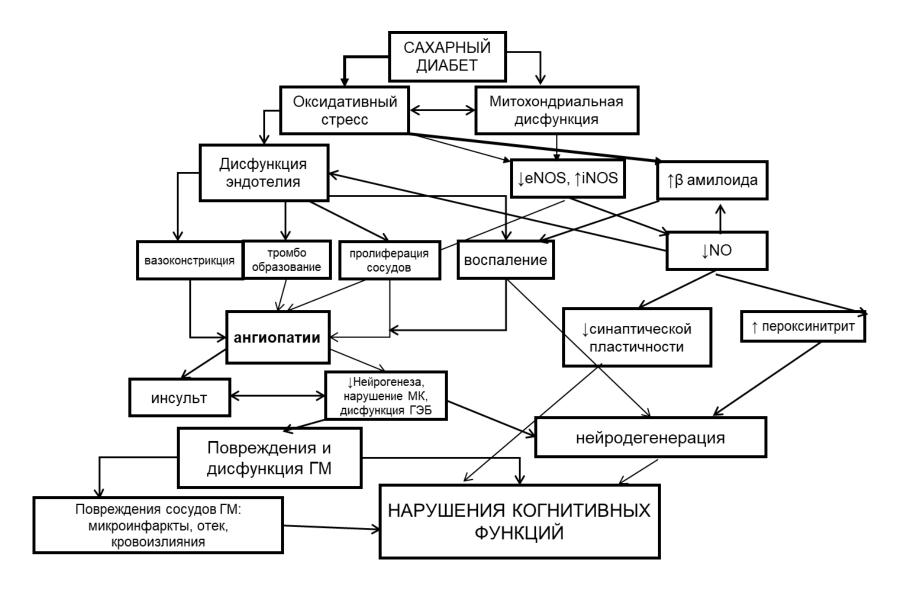


рис. 1. Механизм нарушений когнитивных функций при СД [Perales-Torres A. L., 2016; De Silva T. M., 2016; Battson M. L., 2017; Toth P., 2017

1.3. Хроническое нарушение мозгового кровообращения и когнитивный дефицит

Хроническое нарушение кровообращения мозгового является клиническим синдромом, развивающимся при длительном прогрессирующем поражении головного мозга неинсультного характера, и имеет следующие диагностические формулировки: дисциркуляторная энцефалопатия (ДЭП); хроническая ишемия головного мозга; хроническая сосудистая мозговая недостаточность; цереброваскулярная хроническая недостаточность; хроническая цереброваскулярная болезнь; ишемическая болезнь мозга [Захаров В. В., 2014].

В странах Европы и США определенные симптомы ХНМК связывают с факторами риска и выделяют особенности повреждающего влияния сосудистого фактора на церебральные функции. В тоже время в России в группу пациентов с ХНМК относят всех больных с неоднородными причинами ХНМК и поражением головного мозга вследствие действия сосудистых факторов риска.

СД и гиперхолестеринемия являются основными этиологическими факторами развития сосудистых когнитивных нарушений при цереброваскулярных заболеваниях [Емелин А. Ю., 2015]. Атеросклеротическое поражение артерий при СД 2 типа приводит, как правило, к крупным территориальным инфарктам, реже – к лакунарному поражению, тогда как патология сосудов сопряжена артериолосклерозом мелких c И липогиалинозом. С поражением мелких сосудов связано формирование лакунарных инфарктов, микроинфарктов, кровоизлияний, микрогеморрагий и признаков атрофии серого вещества [Катунина Е. А., 2015] в лимбической системе височно-теменных долях, что связано c ухудшением познавательных функций [Сиі Х., 2014]. Сообщалось, что колебания уровня гликемии могут влиять на объем серого вещества в конкретных участках головного мозга [Cui X., 2014]. В свою очередь снижение когнитивных функций связано прежде всего с вовлечением гиппокампа, таламуса и базальных ганглиев и в меньшей степени – белого вещества [Катунина Е. А., 2015].

Сосудистые когнитивные нарушения являются наиболее частым синдромом при ХНМК и морфологически проявляются в виде инфаркта (постинфарктные кисты), диффузного ишемического повреждения белого вещества (субкортикальная лейкоэнцефалопатия), подкоркового таламуса, фронтобазальных и лимбических отделов [Емелин А. Ю., 2015]. Выделяют умеренные сосудистые когнитивные нарушения, сосудистую сосудисто-дегенеративный деменцию, смешанный тип — сочетание когнитивных нарушений альцгеймеровского типа с цереброваскулярным заболеванием. В группе пациентов с когнитивными нарушениями отмечается большая частота госпитализаций, инвалидизации и смертности по сравнению с больными с сохраненными познавательными функциями [Шмонин А. А., 2014а]. Данный факт может объяснять снижение приверженности лечению у таких пациентов и нарушение способности адекватно оценивать симптомы основного заболевания.

Таким образом, причинами деменции у пациентов с СД могут являться как цереброваскулярная патология, так и дегенеративный процесс [Есин Р.Г., 2013; Левин О.С., 2015].

1.4. Фармакотерапия когнитивных нарушений при ХНМК на фоне СД

Основными целями лечении больных когнитивными \mathbf{c} расстройствами сахарного диабета являются профилактика фоне заболевания, прогрессирования снижение выраженности когнитивных расстройств, повышение качества жизни, включая социальную адаптацию. Снижение интеллекта пациентов может влиять на приверженность к лечению и самоконтроль, что приводит к ухудшению гликемического контроля, повышению частоты тяжелых гипогликемических ЭПИЗОДОВ И

госпитализаций.

Пациенты с сахарным диабетом получают в 2–3 раза больше врачебных назначений, чем в целом в популяции, почти по всем категориям препаратов (сердечно-сосудистые, гастроэнтерологические, антибиотики, психотропные, нейротропные, нестероидные противовоспалительные препараты) [Старостина Е. Г., 20156]. Известно, что чем больше препаратов принимает больной, тем чаще у него возникают трудности с соблюдением схемы лечения [Кирщина И. А., 2013]. Одновременной прием менее пяти ЛП повышает риск развития нежелательных побочных реакций до 5%, а шести и более препаратов – уже до 25%. При этом частота полипрагмазии увеличивается с возрастом и может встречаться у более чем 50% пациентов [Сычев Д. А., 2016], а так как СД 2 типа характеризуется полиморбидностью, такие больные зачастую принимают необоснованно большое количество ЛП. Соответственно увеличивается риск развития нежелательных реакций и снижается приверженность лечению - около 80% больных СД имеют низкую комплаентность [Кирщина И. А., 2013]. Вместе с тем, повышение комплаентности пациентов к терапии СД с 50% до 80% снижает прогнозируемую вероятность макро- и микрососудистых осложнений почти на 30% [Старостина Е. Г., 2015б].

По рекомендациям Американской Ассоциации сахарного диабета (ADA) современная терапия СД должна включать несколько компонентов: 1) достижение и поддержание целевого уровня гликемии (HbA1C); 2) достижение и поддержание целевого уровня липопротеинов низкой плотности; 3) достижение и поддержание целевого уровня артериального давления; 4) первичная и вторичная профилактика инсульта.

Кроме того, ADA рекомендует индивидуализировать лечение диабета с учетом когнитивных возможностей пациентов. В Европе и США в зависимости от уровня снижения когнитивных функций применяются такие препараты, как допенезил (при сосудистой деменции), галантамин (сосудистая деменция и болезнь Альцгеймера), ривастигмин и мемантин (по

данным Американской Академии Неврологии).

В России при различных клинических синдромах обычно используются препараты группы нейропротекторов, однако большая ИХ часть не исследованы по правилам качественной клинической практики — Good Clinical Practice (GCP) [Шмонин А. А., 2014б]. Для улучшения когнитивных функций широко применяются ноотропные препараты, которые можно разделить на группы: 1) препараты, воздействующие нейротрансмиттерные системы (холинергические, глутаматергические, моноаминергические и др.); 2) препараты с нейротрофическим действием; 3) препараты с нейрометаболическим действием; 4) препараты с вазоактивным действием [Фирсов А. А., 2014].

1.5. Возможности инкретинопосредованной терапии нарушений познавательных функций у пациентов с СД

В последние годы растет интерес к гипогликемическим препаратам нового поколения, которые не только эффективно снижали бы уровень глюкозы в крови, но и обладали бы глюкозозависимым действием без риска гипогликемии, а также плейотропными эффектами, в частности, на когнитивную дисфункцию. Одним из перспективных направлений лечения когнитивных нарушений у пациентов с СД является применение средств с инкретиновой активностью, сахароснижающий эффект которых имеет глюкозозависимый характер с отсутствием риска развития гипогликемии.

Существует два основных кишечных гормона с инкретиноподобным действием: глюкагон-подобный пептид-1 (ГПП-1, GLP-1) и глюкозозависимый инсулинотропный пептид (ГИП, GIP). Инкретины стимулируют выделение инсулина β-клетками поджелудочной железы, ингибируют секрецию глюкагона и моторную активность желудка, ускоряют наступление чувства насыщения, что снижает количество потребляемой пищи. Кроме того, инкретины ингибируют апоптоз и стимулируют

пролиферацию и неогенез β-клеток поджелудочной железы [Спасов А.А., 2015], оказывает защитное действие на кровеносные сосуды, увеличивая экспрессию eNOS и тем самым повышая уровень оксида азота в эндотелиальных клетках [Lim D.-M., 2017].

У пациентов с СД 2 типа инкретиновый эффект снижен, что обусловлено нарушением инсулинотропного эффекта ГИП на соответствующие рецепторы поджелудочной железы [Hammersjö R., 2016], а также более низкой секрецией ГПП-1 при сохранной секреции ГИП [Раскина К., 2015; Тюренков И.Н., 2015]

Разнообразие физиологических эффектов ГПП-1 и ГИП связано с обширным распределением их рецепторов в организме: ГИП - островковые клетки поджелудочной железы, кишечник, жировая ткань, сердце, гипофиз, кора и другие отделы головного мозга; ГПП-1 рецепторы локализованы в гастроинтестинальной системе, α- и β-клетах поджелудочной железы), легких, почках, сердце и различных отделах головного мозга [Tramutola A., 2016].

В время, как на периферии рецепторы $\Gamma\Pi\Pi$ -1 обладают инсулинотропными функциями, в то же время в головном мозге они связаны с механизмами нейропротекции [Tramutola A., 2016]. Активация рецепторов ГПП-1 (при связывании с α-субъединицами G-белка) повышает содержание цАМФ внутри клетки, что в свою очередь приводит к: 1) повышению продукции протеин-киназы А (РКА) и цАМФ-связывающего белка Ерас2 (Exchange protein directly activated by cAMP); 2) повышению содержания Ca²⁺ внутри клетки; 3) повышению транскрипции таргетных генов. Повышение содержания внутриклеточного Са²⁺ вследствие усиления его потока через высвобождения потенциал-зависимые кальциевые каналы И ИЗ эндоплазматического ретикулума посредством активации протеин-киназы С (РКС) приводит к увеличению секреции инсулина. Кроме того, протеинкиназа А (РКА) стимулирует фосфорилирование транскрипционного фактора **CREB** (cAMP response element-binding protein), который

транскрипцию генов, связанных с процессами синаптической пластичности и памяти. Помимо этого, активация рецепторов ГПП-1 связана с увеличением фосфорилирования и активацией фосфоинозитол-3-киназы (PI3K/Akt), которая регулирует рост и выживание клеток как на периферии, так и в головном мозге [Саприна Т. В., 2013; Симаненкова А. В., 2014; Власов Т. Д., 2016; Tramutola A., 2016; Yang J. L., 2016; Niu B., 2017]. Вышеперечисленные механизмы обуславливают нейропротекторное действие ГПП-1.

1.6. Обзор групп ЛП с инкретиновой активностью

В настоящее время на рынке представлены 2 группы препаратов с инкретиновой активностью: аналоги ГПП-1, имитирующие действие глюкагонподобного пептида-1, и ингибиторы ДПП-4, пролонгирующие действие эндогенного ГПП-1.

1.6.1. Агонисты ГПП-1

В исследованиях, проведенных на животных с экспериментальной диабета (стрептозацин/никотинамидная моделью сахарного подкожное введение агониста ГПП-1 эксенатида (0,1 мкг/кг дважды в день в течение 2 недель) приводило к меньшим нарушениям в обучении и памяти лабораторных крыс, а уровни экспрессии факторов CREB и BDNF (нейротрофический фактор мозга, brain-derived neurotrophic factor) B гиппокампе снижались меньше, чем в группе, не получавшей лечение [Gumuslu E., 2016]. Сообщалось, что терапия другим агонистом ГПП-1 – лираглутидом предотвращала ожидаемое снижение церебрального метаболизма глюкозы (Cerebral Glucose Metabolism, CMRglc), который отражает прогрессирование заболевания, наблюдаемое в группе плацебо [Geil M., 2016].

Liuc W. и соавторы [2015] сообщали о нейропротективных свойствах

ликсисенатида и лираглутида при исследовании в мышиной болезни Паркинсона. Препараты предотвращали двигательные нарушения в тестах Ротарод, открытое поле и в ходе каталепсического теста. Также наблюдалось снижение уровня тирозин гидроксилазы в черной субстанции и базальных ганглиях, уменьшение про-апоптотических сигнальных молекул ВАХ и увеличение анти-апоптотических сигнальных молекул В-клеток лимфомы-2, что свидетельствует о нейропротективных свойствах этих препаратов. В настоящее время лираглутид является одним из самых изучаемых агонистов ГПП-1 рецептора, его применение как в монотерапии, так и в комбинации с гипогликемическими препаратами эффективно гликемический контроль у пациентов с СД и хорошо переносится. В многочисленных исследованиях отмечается его способность снижать массу тела, оказывать протективное действие в отношении сердечно-сосудистой системы, а также имеются, пока единичные, работы в которых обнаружена его защитная роль в отношении некоторых нейродегенеративных заболеваний [Gejl M., 2016].

Ликсисенатид предотвращает Аß-индуцированное снижение пространственного обучения у крыс, улучшает долговременное потенцирование (long term potentiation, LTP) и минимизирует когнитивный дефицит [Athauda D., 2016]. Как и в отношении лираглутида, у ликсисенатида отмечается наличие нейропротекторных свойств, в том числе и при нейродегенеративных заболеваниях [Liuc W, 2015; Athauda D., 2016], однако их клиническая значимость продолжает изучаться.

Все имеющиеся в настоящее время на рынке агонисты ГПП-1 являются препаратами для инъекционного применения, что может быть не очень удобно пациентам (например, для получения суспензии микросфер с эксенатидом необходимо использовать разбавитель непосредственно перед инъекцией, для чего требуется определенная подготовка со стороны пациента) [LaRue S., 2015; Kalra S., 2016]. Поэтому разрабатываются соединения, которые позволили бы сократить инъекции препарата (за счет

увеличения периода полувыведения) или альтернативные способы доставки действующего вещества - пероральные формы и системы непрерывного подкожного выпуска лекарства (сроком на 12 месяцев). Активно ведется поиск соединений, оказывающих влияние на несколько рецепторов (мультиагонисты), в том числе ГПП-1, ГПП-2, ГИП, глюкагон, гастрин и т. д. В фазе II клинических исследований находятся ТТ-401 (агонист ГПП-1/глюкагоновых рецепторов, Eli Lilly) и RG7697 (агонист ГПП-1/ГИП, Ноffmann-La Roche), несколько находится на I фазе или доклинических испытаниях [Finan B., 2015].

1.6.2. Ингибиторы ДПП-4

Фермент ДПП-4 инактивирует ГПП-1, в связи с чем последний разрушается в течение 2-5 минут. Ингибиторы ДПП-4 продлевают периоды полураспада циркулирующих ГПП-1 и ГИП. За счет увеличения концентрации этих циркулирующих инкретинов, ингибиторы ДПП-4 улучшают контроль уровня глюкозы у пациентов с СД 2 типа.

Сообщалось O нейропротекторных свойствах вилдаглиптина И саксаглиптина У крыс co стрептозацининдуцированной болезнью Альцгеймера. Лечение вилдаглиптином приводило к полному отсутствию когнитивного дефицита, улучшению памяти в тестах радиальный лабиринт (Radial arm maze) и Норковая камера (Hole-board), а также дозозависимому т-фосфорилирования, АВ И воспалительных снижению маркеров, саксаглиптин минимизировал когнитивный дефицит, снижал концентрацию амилоида, фосфорилирование т-белка и воспаление в головном мозге [Kosaraju J., 2013].

Применение линаглиптина у мышей 3xTg-AD (трансгенная линия мышей с болезнью Альцгеймера) дозозависимо снижало когнитивный дефицит, ослабляло процессы τ-фосфорилирования, нейровоспаления и β-амилоидирования [Kosaraju J., 2017].

1.6.3. Агонисты GPR119

В настоящее время в экспериментальных исследованиях и на здоровых добровольцах [Nunez D., 2014] установлено, что агонисты GPR119 увеличивают уровни циркулирующих ГПП-1, ГИП и пептида тирозинтирозина (РҮҮ), который, по некоторым данным, связан с когнитивными функциями и нарушениями поведения [Stadlbauer U., 2013].

Применение агонистов GPR119 представляет собой совершенно новый и не исследованный ранее подход к инкретиновой терапии пациентов с СД 2 типа, увеличивающий глюкозозависимую секрецию инсулина через два дополнительных механизма: непосредственно, действуя на β-клетки, и опосредованно, поскольку их стимуляция приводит к усилению секреции ГПП-1 и ГИП из желудочно-кишечного тракта. Также стоит отметить очевидные потенциальные преимущества у агонистов GPR-119 - это снижение аппетита и массы тела, отсутствие риска развития гипогликемии при их применении.

В экспериментальных исследованиях на мышах показано, что эндогенный лиганд GPR119 олеоилэтаноламид (ОЕА) снижает проявление брадикинезии и леводопа-индуцированных дискинезий при болезни Паркинсона, уменьшает воспаление, модулирует глиальные процессы, связанные с нейрональной выживаемостью [More S. V., 2015]. Точный механизм нейропротекции ОЕА остается не известным, но все больше доказательств свидетельствует о том, что он реализуется посредством его противовоспалительных и антиоксидантных свойств, а также путём модуляции нейрональной активности [Sayd A., 2015].

Что касается синтетических агонистов GPR119, в настоящее время они находятся на разных стадиях клинических и доклинических испытаний.

Соединения PSN-821 и PSN842 в доклинических исследованиях существенно снижали уровень глюкозы, потребление пищи, массу тела в

моделях ожирения у грызунов. Они стимулировали продукцию инсулина НІТ-Т15 клетками и ГПП-1 Glu-Tag клетками, дозозависимо регулировали продукцию РҮҮ, ГПП-1 и ГИП [Goodman M. L., 2011]. Соединение МВХ-2982 в доклинических исследованиях вызывало глюкозозависимую секрецию инсулина (GSIS) из островковых клеток (в экспериментах in vitro), повышало секрецию инсулина при гипергликемии у крыс, снижало отклонение глюкозы (площадь под кривой «концентрация глюкозы-время» (AUC) и повышало плазменный уровень ГПП-1 и ГИП при проведении глюкозотолерантного теста у мышей и крыс [Roberts B., 2010]. Соединение BMS-903452 значительно увеличило уровень активного ГПП-1 у крыс SD, причем независимо от введения глюкозы [Wacker D. A., 2014].

Al-Barazanji K. с соавторами в своем исследовании сравнивали эффекты соединения GSK 706 и метформина в монотерапии и в комбинации у мышей с DIO диет-индуцированным ожирением) И гиперинсулинемией Концентрация активного ГПП-1 в плазме была значительно ниже в группе, получавшей только GSK706 (39,7%), тогда как в группах с метформином она была существенно выше (в группе, получавшей 30 мг/кг метформина на 68,5%, 100 мг/кг - 120,2%). Комбинация GSK706 + метформин 30 и 100 мг/кг значительно увеличила концентрацию активного ГПП-1 в плазме DIO мышей на 105,1% и 251,3%, соответственно [Al-Barazanji K., 2015]. Соединения PSN-821 и PSN842 в доклинических исследованиях существенно снижали уровень глюкозы, потребление пищи, массу тела в моделях ожирения у грызунов. Они стимулировали продукцию инсулина НІТ-Т15 клетками (эпителиальные островковые клетки хомяка, hamster islet B-cell) и ГПП-1 клетками GLUTag (энтероэндокринная клеточная линия кишечника мышей, которая управляемо экспрессирует ген препроглюкагон и секретирует ГПП-1), дозозависимо регулировали продукцию РҮҮ, ГПП-1 и ГИП [Goodman M. L, 2011]. Пероральное GSK252A (10 $M\Gamma/K\Gamma$) введение крысам приводило четырехкратному увеличению концентрации ГПП-1, двукратному ГИП, трехкратному РҮҮ и двукратному глюкагона по сравнению с контрольной группой [Shah U., 2010]. Сообщалось, что соединение AR231453 существенно снижает концентрацию глюкозы в крови, стимулирует секрецию ГПП-1 и ГИП у мышей C57BL/6J, но не влияет на продукцию ГИП у мышей knockout-GPR119 (GPR119(-/-). Одновременное применение AR231453 (10 мг/кг перорально) с ингибитором ДПП-4 ситаглиптином (1 мг/кг) у мышей C57BL/6 приводило к синергическому увеличению уровня активного ГПП-1 (в 4 раза по сравнению с группами, принимавшими только один препарат) [Chu Z.-L, 2008].

1.6.4. Соединение ZB-16 в качестве перспективного агониста GPR119

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

ZB-16 обладает выраженной агонистической активностью в отношении рецептора GPR119 (EC₅₀ 7,25 нМ). Его пероральное введение животным с никотинамид-стрептозотацин-индуцированным сахарным диабетом снижает концентрацию глюкозы в крови, улучшает её утилизацию при проведении перорального глюкозотолерантного теста, снижает массу тела животных и потребление ими пищи при содержании их в условиях высокожировой и калорийной При морфологическом диеты. исследовании ткани поджелудочной железы животных никотинамид-стрептозотоцинcиндуцированным СД было обнаружено, что у тех, которым перорально вводили ZB-16 (1 мг/кг), отмечалось больше неповреждённых β-клеток, меньшее содержание маркера апоптоза (каспаза 3) и больше пролиферации (Ki67). Было также обнаружено, что ZB-16 увеличивает секрецию ГПП-1 и инсулина как у интактных, так и у животных с экспериментальным сахарным диабетом.

Введение соединения ZB-16 (per os, 4 недели, 1 мг/кг) животным, которые содержались в условиях высокожировой и калорийной диеты приводило к достоверному снижению количества потребляемого ими корма и проявления массы тела, триглицеридов В крови И эндотелиальной дисфункции (улучшалась эндотелийзависимая вазодилатация, снижалось число десквамированных эндотелиоцитов) особенно при одновременном введении ZB-16 (per os, 4 недели, 1 мг/кг) и метформина (per os, 4 недели, 400 мг/кг). Так же было обнаружено, что у этих животных уменьшался прокоагуляционный гемостаз. Пероральное введение ZB-16 (01, 1 и 10 мг/кг) интактным и животным с никотинамид-стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом дозозависимо пролонгирует действие экзогенного инсулина (концентрация глюкозы в плазме крови снижалась более выраженно и на более длительный срок). При исследовании церебропротекторного ZB-16 действия соединения было обнаружено, что его лечебнопрофилактическое введении интактным животным сопоставимо гибель. шитиколином снижает ИΧ a выживших уменьшает психоневрологический дефицит после перевязки общих сонных артерий. При патоморфологическом исследовании головного мозга было подтверждено, лечебно-профилактическое введение ZB-16 и его комбинации с метформином снижают выраженность патологических изменений в тканях головного мозга при моделировании фокальной ишемии головного мозга на фоне 4 недельного никотинамид-стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета.

Таким образом, сахарный диабет как таковой вызывает когнитивные нарушения, ограничение мозгового кровотока, связанное со стенозированием магистральных и мелких церебральных сосудов вследствие атеросклероза, тоже ведет к развитию когнитивного дефицита, а сочетание патологий в еще большей степени усугубляет нейродегенерацию и нарушение познавательных функций. Рецепторы к ГПП-1 локализованы в различных структурах головного мозга, их активация, по литературным данным, при СД может

уменьшать выраженность психоневрологических нарушений [Саприна Т. В., 2013; Симаненкова А. В., 2014; Власов Т. Д. 2016; Tramutola A., 2016; Yang J. L., 2016; Niu B., 2017]. Гипогликемические ЛС, снижающие уровень глюкозы за счёт активации системы инкретинов, прямо или косвенно оказывают нейропротективное действие при СД, сводя к минимуму нарушения памяти и выраженности когнитивного дефицита. Особое внимание в последние годы привлекают агонисты GPR119, которые стимулируют выделение эндогенных инкретинов, и наряду с сахароснижающим оказывают нейропротективное Вышеизложенная информация действие. послужила основанием выполнения данного исследования, целью которого является экспериментальное обоснование применения агониста **GPR119** при когнитивных нарушениях, связанных с хроническим нарушением мозгового кровообращения и гипергликемией.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Экспериментальные животные

Исследование выполнено на 120 беспородных крысах-самках возрасте 12 месяцев, масса – 300-350 г. (ФГУП «Питомник лабораторных животных «РАППОЛОВО», д. Рапполово, Всеволожский р-н, Ленинградская Россия). Животные содержались в полипропиленовых (545х395х200 мм, Тип: Т/4В, ООО «МЭСТ», г. Москва) на подстиле из стружек мягких пород дерева, по 8-10 особей со свободным доступом к воде и гранулированному корму (ГОСТ Р 51849-2001, ООО «Лабораторкорм», Москва, Россия) в стандартных условиях вивария с 12ч/12ч свето/темновым 20±2°C И 40-60%. температурой воздуха влажностью циклом, Экспериментальные группы формировались по истечению карантинного периода (2 недели) с использованием случайного распределения по группам. Исследовательские манипуляции выполняли в один и тот же период суток для сведения к минимуму влияния суточных биоритмов на результаты.

Эксперименты проводились в соответствии с Приказом МЗ и СР РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики», с ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», с ГОСТ Р 51000.4-2011 «Общие требования к аккредитации испытательных лабораторий», с соблюдением Международных рекомендаций «Европейской используемых конвенции ПО защите позвоночных животных, ДЛЯ экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986) и были Этическим одобрены Региональным Независимым Комитетом (ГУ Волгоградский Медицинский Научный Центр, протокол № 2114-2017 от 07 апреля 2017). Хирургические процедуры и эвтаназия животных при выведении из эксперимента выполнялись с использованием хлоралгидрата в 800 $M\Gamma/K\Gamma$ (внутрибрюшинно). дозе

2.2. Исследуемое соединение и препараты сравнения

Исследуемое соединение

Исследуемое соединение 5-хлор-2-(4-{[4-(3,3-диоксидо-1,3-бензоксатиол-6-ил)-2-фторфенокси]метил} пиперидин-1-ил)пиримидин под лабораторным шифром ZB-16 (дипиарон) было синтезировано в АО «ИИХР» (г. Химки, РФ) и представляет собой высокоселективный агонист рецептора GPR119 (EC₅₀ M - 7,25 нM) [Chafeev M.A., 2015]. Соединение ZB-16 вводилось перорально один раз в сутки в дозе 1 мг/кг.

Препараты сравнения

Для исследования влияния агониста GPR119 на когнитивные функции крыс при XHMК на фоне никотинамид-стрептозотацин-индуцированного СД были использованы препараты сравнения с наиболее схожим механизмом действия, т. к. лекарственные средства данной группы пока не вышли на рынок.

Первым препаратом сравнения был взят препарат из группы ингибиторов ДПП-4 ситаглиптин, так как данная группа наиболее близка по механизму действия агонистам GPR119. Ингибиторы ДПП-4 продлевают периоды полураспада циркулирующих инкретинов ГПП-1 и ГИП, замедляя их разрушение, а агонисты GPR119 стимулируют секрецию эндогенных ГПП-1 и ГИП, повышая их концентрацию в плазме крови. Кроме того, обе группы препаратов применяются перорально один раз в сутки.

Среди препаратов группы ингибиторов ДПП-4 в качестве препарата сравнения был выбран ситаглиптин (Янувия, Merck Sharp & Dohme B.V. Нидерланды) — первый и наиболее изученный представитель данного класса, зарегистрирован FDA в 2006 году, и применяется в России с 2007 года. Ситаглиптин имеет биодоступность 87%, период полураспада от 10 до 12 часов [Аметов А. С., 2015], ингибирует активность ДПП-4 в течение 24 часов, начало его действия наступает примерно через 30 минут после приема препарата, а уровень эндогенного ГПП-1 возрастает в 2-3 раза [Шестакова М.

В., 2010]. В нашем исследовании ситаглиптин вводился перорально в дозе 10 мг/кг.

Вторым препаратом сравнения был выбран метформин (400 мг/кг, per os), препарат первого ряда в лечении СД 2 типа [Дедов И. И. 2017а].

2.3. Дизайн исследования

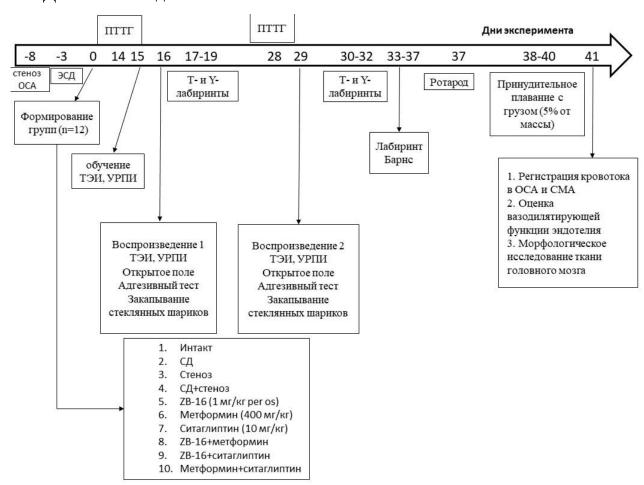


рис. 2. Дизайн исследования. Примечание. Указаны дни исследования: 0 день – распределение животных по группам и начало лечения; регистрация кровотока в ОСА и проекции СМА, оценка функционального состояния эндотелия проводились по окончании всех поведенческих тестов.

Хроническую недостаточность мозгового кровообращения вызывали стенозированием общих сонных артерий (ОСА) с ограничением кровотока по каждой до 50%, под общей анестезией (золетил 20 мг/кг и ксилазин 8 мг/кг внутрибрюшинно). Оценка скорости кровотока по стенозированным артериям проводилась лазерной допплерографией до и после операции сразу

после наложения лигатур [Тюренков И. Н., 2017а].

Экспериментальный никотинамид-стрептозотоцин-индуцированный СД моделировали через 5 дней после стенозирования ОСА (это время необходимо для послеоперационного восстановления животных). ЭСД вызывали внутрибрюшинным введением никотинамида (230 мг/кг) и через 15 минут стрептозотоцина (65 мг/кг).

Через 3 суток после моделирования СД определяли уровень глюкозы крови, взятой из подъязычной вены, с помощью портативного глюкометра (Contour TC Bayer, Германия).

Согласно данным литературы, критерием включения в исследование животных с сахарным диабетом является уровень гликемии как измеренный натощак, так и без пищевой депривации (non-fasting) [Shimizu R., 2012; Okoduwa S.I.R, 2017]. Тем не менее одним из наиболее распространенных методов оценки гомеостаза глюкозы является пероральный тест толерантность к глюкозе (ПТТГ), который определяет способность животных адекватно переносить глюкозную нагрузку [Bowe J. E., 2014], а его результат зависит от скорости утилизации глюкозы тканями и позволяет судить о глюкозотолерантности. Через 2 часа после ПТТГ уровень гликемии интактных животных не должен сильно отличаться от первоначального значения, измеренного после 6-ти часовой депривации [Leiter E. H., 2009]. Поэтому, для исключения ложноотрицательных результатов, которые могли бы быть получены при определении уровня глюкозы натощак, для выполнения дальнейшего исследования отбирали животных с уровнем гликемии через 2 часа после нагрузки глюкозой (3г/кг, 40% раствор) от 11 до 19 ммоль/л. Далее животных распределяли по группам в соответствии с принципом (табл. 1). рандомизации

Таблица 1. Экспериментальные группы животных

	No	Патология	Лечение	Длительность лечения		
	1	Интакт	Дистиллированная вода	40 дней (лечение)		
Без лечения			(позитивный контроль)			
	2	ХНМК	Дистиллированная вода	40 дней (лечение)		
	3	СД	Дистиллированная вода	40 дней (лечение)		
	4	ХНМК+СД	Дистиллированная вода	40 дней (лечение)		
С лечением	5	ХНМК+СД	ZB-16	40 дней (лечение)		
	6	ХНМК+СД	метформин	40 дней (лечение)		
	7	ХНМК+СД	ситаглиптин	40 дней (лечение)		
	8	ХНМК+СД	ZB-16 + метформин	40 дней (лечение)		
	9	ХНМК+СД	ZB-16 + ситаглиптин	40 дней (лечение)		
	10	ХНМК+СД	Метформин+ситаглиптин	40 дней (лечение)		

Животные получали лечение на протяжении 40 дней (после введения никотинамида и стрептозотоцина), 1 раз в день, перорально. Из-за невозможности одновременного наблюдения за большим числом животных, входящих в 10 групп, исследование было выполнено в 3 потока, которые включались в эксперимент последовательно: по 40 животных через 5 дней.

Уровень гликемии измеряли после 6 часовой пищевой депривации на 14 и 28 дни после начала лечения в ходе перорального теста толерантности к глюкозе.

Показатели психоневрологического дефицита, состояние когнитивных и сенсорно-моторных функций животных оценивали на 15 и 29 дни после начала лечения в тестах ТЭИ, УРПИ, Открытое поле, адгезивном тесте, закапывания стеклянных шариков, в Т- и У-лабиринтах, а на 29 день дополнительно в лабиринте Барнс, тесте удержания на вращающемся стержне (Ротарод) и тесте принудительного плавания с грузом (5% от массы животного).

После оценки всех элементов поведения проводилась оценка уровня локального мозгового кровотока (ЛМК) в двух точках, в месте стеноза ОСА и в проекции средней мозговой артерии. Доступ к СМА создавался следующим образом: наркотизированному животному с использованием депиляционного крема удалялся шерстяной покров и кожный лоскут в верхней поверхности черепа, который В последствии скальпировался. Далее c учетом стереотаксических координат, началом которых принималась точка брегма, определялось место установки датчика (в проекции средней мозговой артерии), голова животного и датчик фиксировались в стереотаксической трепанационное отверстие производилось конической зуботехнической фрезой. После операции животные выводились эксперимента передозировкой хлоралгидрата (800 мг/кг внутривенно).

2.4. Моделирование хронической недостаточности мозгового кровообращения

2.4.1. Модели стенозирования общих сонных артерий

Существует несколько моделей стенозирования ОСА.

- 1. С использованием игл. После наркоза животным делается срединный разрез на передней поверхности шеи, выделяются обе ОСА, накладываются две лигатуры, чтобы прочно связать правую сонную артерию и иглу вместе. После этого игла убирается таким образом, чтобы лигатура оставалась на месте, и артерия занимала свободное пространство в просвете завязанной лигатуры. Затем процедуру повторяют для левой общей сонной артерии. Диаметр металлической иглы подбирается так, чтобы объем мозгового кровотока после ее удаления восстанавливался до 45-50% от начальных значений. В результате описанных манипуляций кровоток по сонным артериям ограничивается в среднем на 50-60%, а в головном мозге на 40-45% от начальных значений [Тюренков И. Н., 2017а; Matin N., 2016].
 - 2. С использованием микроспиралей [Shibata M., 2004]. После

выделения обеих ОСА, две нейлоновые нити располагаются вокруг дистальной и проксимальной части правой ОСА. После этого артерия аккуратно поднимается с помощью этих нитей, и путем вращения микроспирали вокруг ОСА помещается между петлями микроспирали чуть ниже зоны каротидной бифуркации. Левая ОСА окклюдируется аналогичным образом либо сразу же [Hase Y., 2017], либо спустя 30 минут после правой ОСА [Shibata M., 2004; Hattori Y., 2016].

3. С использованием амероидных констрикторов. Они представляют собой незамкнутое стальное (титановое) кольцо со специальным полимером (амероидом) внутри, который медленно набухает и закрывает просвет сосуда. Методика операции аналогична использованию спиралей. При применении амероидных констрикторов просвет сосудов сужается постепенно, снижение мозгового кровотока происходит плавно, без резкого падения, и составляет к 28 дню от 50 % [Hattori Y., 2016] до 70% и более [Hattori Y., 2014] по сравнению с дооперационными значениями.

Данные модели стенозирования общих сонных артерий характеризуются постоянным нарастанием окклюзии, что может привести к полной закупорке сосудов. Механическая жесткость игл и их ограниченный размерный ряд затрудняет манипуляции с сосудами. Поэтому в исследовании в качестве ограничителя диаметра артерии была применена нейлоновая нить.

2.4.2. Выполнение процедуры частичного стенозирования общих сонных артерий

Операционные процедуры проводились с использованием наркоза золетил 20 мг/кг и ксилазин 8 мг/кг внутрибрюшинно.

Подготовка операционного поля

Животное фиксировалось узким лейкопластырем за лапы в положении на спине на хирургическом столике. Волосяной покров с передней части шеи удалялся депиляционным кремом от нижней челюсти до грудины, поверхность кожи обрабатывалась раствором 70% спирта.

Оперативный доступ к общим сонным артериям.

Отступив 0,5 см от грудины выполняется продольный разрез по срединной линии шеи длинной 2 см. Подкожно жировой слой разрезается сосудистыми ножницами, края раны разводятся в стороны с использованием зажимов. Выделяется сонный треугольник, образованный сверху двубрюшной мышцей, латерально – грудино-ключично-сосцевидной мышцей и медиально – грудино-подъязычной мышцей. Далее выделяется сосудистонервный пучок, образованный общей сонной артерией и блуждающим нервом, который орошается 2% раствором лидокаина. Выделение общей сонной артерии производится без прикосновения к блуждающему нерву.

Выполнение процедуры стенозирования общих сонных артерий.

В качестве лигатуры используется не рассасывающийся шовный материал. После выделения общих сонных артерий под них подводятся лигатуры и нейлоновая нить диаметра 4-0, к которой привязывается сосуд. В последующем нить извлекается, сосуд занимает свободное пространство под лигатурой, и просвет сосуда восстанавливается на величину, равную диаметру нейлоновой нити. Аналогичная операция выполняется на другой общей сонной артерии.

Оценка скорости кровотока по общим сонным артериям проводилась лазерной допплерографией до и после стенозирования сразу после наложения лигатур с помощью полиграфа MP150, модуля для лазердопплеровской флоуметрии LDF100C и программного обеспечения AcqKnowledge 4.2 (Biopac Systems, USA).

Операционное поле обрабатывалось раствором хлоргексидина 0,05%, рану ушивали кисетным швом, который в свою очередь обрабатывался раствором йода.

Кровопотеря во время операции незначительная, в виде капиллярного кровотечения при рассечении кожного покрова.

Постоперационное наблюдение.

После операции животные помещаются в большие клетки с чистыми

опилками по 5-6 особей. На пол клетки в чашке Петри помешается увлажненный корм. В течение 72 часов животные находятся под наблюдением.

2.5. Моделирование никотинамид-стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета

Хроническую гипергликемию моделировали через 5 дней после стенозирования ОСА (это время необходимо для послеоперационного качестве восстановления животных). В модели сахарного диабета использовали никотинамид-стрептозотоцин-индуцированный СД, который вызывали путем однократного внутрибрюшинного введения никотинамида (230 мг/кг) [Спасов А.А., 2011; Мазо В.К., 2016] и через 15 минут стрептозотоцина (65 мг/кг, Sigma-Aldrich, США). Предварительно, за 12 часов (на ночь) животные лишались пищи со свободным доступом к воде. Стрептозотоцин разводили холодным цитратным буфером (1мМ, рН 4.5) в темной таре, для разведения никотинамида использовали раствор NaCl (0,9%).

Спустя 72 часа после введения стрептозотоцина измеряли уровень глюкозы в крови, взятой пункцией подъязычной вены, портативным глюкометром (Contour TC Bayer, Германия), и для эксперимента отбирали животных с уровнем гликемии после 6-ти часовой пищевой депривации от 11 до 19 ммоль/л. Далее животных распределяли по группам в соответствии с принципом рандомизации (табл. 1), но с равным средним уровнем глюкозы крови в группе (±5%).

2.6. Определение уровня глюкозы крови

Методика измерения уровня гликемии.

Измерение уровня глюкозы в крови проводили после 6 часовой пищевой депривации на 14 и 28 дни после начала лечения. Для измерения

использовали кровь из подъязычной вены. Уровень глюкозы определяли вышеуказанным методом.

Проведение перорального теста на толерантность к глюкозе

Пероральный тест на толерантность к глюкозе проводили на 14 и 28 дни после начала лечения. За 6 часов до процедуры животные лишались корма, но с сохранением свободного доступа к воде. Раствор глюкозы 40% (3 г/кг, «глюкозная нагрузка») вводили однократно перорально с предварительным и последующим определением концентрации глюкозы в крови через 30, 60 и 120 мин [Спасов А.А., 2012]. После построения графиков «уровень гликемиивремя» рассчитывали площади под кривой в программе Microsoft Office Excel 2013.

2.7. Оценка когнитивного дефицита

2.7.1. Тесты «Условная реакция пассивного избегания» (УРПИ) и тест «экстраполяционного избавления» (ТЭИ)

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

Установка для теста УРПИ представляет собой камеру с освещением, соединенную проходом с темной камерой с электрическим полом (ООО «Нейроботикс», Россия). Тест УРПИ проводили в 3 этапа: «обучение» на 15-й день после начала лечения, «воспроизведение №1» (для проверки запоминания) на 16-й день и «воспроизведение №2» на 29 день [Тюренков И. Н., 2016а]. На этапе «обучения» животное помещали в светлый отсек установки, из которого оно самостоятельно переходило в темный отсек с электродным полом, где получало болевое раздражение (U=40B, 3 импульса по 0,5 сек). При повторном заходе в темный отсек животное также получало

болевое раздражение. Длительность наблюдения — 3 минуты. Спустя 24 часа на этапе «воспроизведения №1» животное опять помещали в светлый отсек установки, и наблюдали за ним в течение 3-х минут. Крысы, зашедшие в темный отсек на этапе «воспроизведения №1» исключались из эксперимента. Через 29 дней после начала лечения проводили «воспроизведение №2». Фиксировался латентный период первого захода в темный отсек, при этом болевое раздражение не наносилось.

Установка для ТЭИ (Open Science, Россия) представляет собой цилиндрическую емкость (высота 40 см, диаметр 35 см), в которую до определенного уровня наливается вода (t=22°C). В центре емкости вертикально закреплен цилиндр, нижняя часть которого опущена в воду на 2,5 см. На этапе «обучения» (15-й день после начала лечения) животное помещалось хвостом вниз во внутренний цилиндр и в течение 3-х минут оно должно было решить задачу - поднырнуть под край цилиндра, после чего животное извлекалось. Первое воспроизведение ТЭИ проводили на 16-й, а второе на 29-й день лечения, и фиксировали время решения задачи: латентный период подныривания [Воронина Т.А., 2012; Островская, Р.У., 2012].

2.7.2. Оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в тесте «Открытое поле»

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

следующие параметры: количество пересеченных квадратов, что трактуется как спонтанная двигательная активность; суммарное количество стоек и количество обследованных отверстий-норок — как ориентировочно-исследовательская активность [Воронина Т.А., 2012], время нахождения в центре поля и на периферии, груминг.

2.7.3. Оценка тактильной чувствительности и мелкой моторики при проведении адгезивного теста

Адгезивнный тест позволяет оценить сенсорную и сенсорно-моторную функцию животных. Рулонный лейкопластырь нарезался квадратами по 5х5 мм и наклеивался на внутреннюю поверхность передних лап, после чего крыса помещалась в клетку и наблюдалась в течение 3 минут. Фиксировалось время, за которое животное обратит внимание на посторонний предмет (сенсорная функция) и удалит его (сенсорно-моторная функция) [Зухурова М. А., 2013; Bracko O. 2014].

2.7.4. Тест закапывания стеклянных шариков

Тест закапывания стеклянных шариков (marble burying test) традиционно рассматривается как модель обсессивно-компульствного расстройства, но может также отражать уровень тревожности животных [Albelda N., 2012].

В клетке размером 60х40х30 см, дно которой было покрыто слоем мелких стружек на 5 см, сверху раскладывали равноудаленно 20 стеклянных шариков диаметром 1 см, крысу помещали в клетку на 30 минут, после чего подсчитывали количество закопанных шариков на 2/3 диаметра и более, число сдвинутых с места и количество нетронутых шариков. Тест проводили на 16-й- и 29-й дни после начала лечения. Считается, что животные используют доступный материал подстилки, чтобы закопать нежелательные

источники дискомфорта (стеклянные шарики), находящиеся в домашнем окружении. Число закопанных шариков может отражать выраженность стереотипного поведения животного и уровень тревожности [Шабанов П. Д. 2016; Joel D., 2006; Albelda N., 2012].

2.7.5. Оценка обучаемости и рабочей памяти крыс в Т-и Y-образных лабиринтах

Т- и Y-образные лабиринты позволяют исследовать обучаемость, рабочую (кратковременную) и долговременную декларативную (эксплицитную) пространственную память крыс [Герасимова Е. В., 2016]. Этот вид памяти является гиппокамп-зависимым, и результаты тестирования в лабиринтах могут свидетельствовать о дисфункции гиппокампа [Амикишиева А. В., 2009].

Т-образный лабиринт состоит из стартового отсека (6 x 6 см), центрального рукава (30 x 6 см) и симметричных боковых рукавов (30 x 6 см), У-образный лабиринт представляет собой вариант радиального (8-лучевого) лабиринта, состоящего из центральной части диаметром 34 см и 8 лучей (коридоров) длиной 86 см. В данном случае для создания У-лабиринта 5 лучей было закрыто, один луч с кормушкой всегда открыт, и еще один закрывался на время обучения.

В этих тестах животных обучали навыку отыскания пищи - вырабатывали условно-рефлекторную реакцию побежки из стартового рукава в боковой (левый), где находилась кормушка. За 1 день до начала эксперимента крыс помещали на 10 мин в лабиринт для приучения к обстановке опыта, животные могли перемещаться по лабиринту при всех поднятых перегородках.

В первый день тестирования (15-й день) каждое животное делало по 20 попыток: 10 обучение (пустой рукав закрыт) и 10 воспроизведение (пустой рукав открыт), каждое длительностью по 2 минуты. Если животное при

воспроизведении теста выбирало рукав с приманкой 8 и более раз, оно считалось обученным, и на протяжении следующих дней тестирования пустой рукав был всегда открыт, в противном случае процесс обучения продолжался. Обучение/воспроизведение проводили в течение 6-ти дней: 3 дня через две недели после начала лечения (17-19 дни) и еще 3 дня через 4 недели (30-32 дни).

При воспроизведении тестов фиксировались следующие показатели: количество животных, нашедших приманку с открытым пустым рукавом за 2 минуты; среднее время подхода к кормушке за 10 попыток; среднее время за 10 попыток, проведенное в развилке, которое является показателем ориентационной активности [Никольская К. А., 2010]. В течение этого времени животное принимало решение, в какую сторону идти: к приманке (считалось правильным решением), в неподкрепляемый рукав (считалось ошибкой) [Самотруева М. А., 2009] или вернуться в свой рукав. Если животное по окончании 2-х минут оставалось в развилке и не принимало никакого решения, это расценивали как «отказ» от решения [Голибродо В. А., 2014]. Если же крыса не находила кормушку по окончании 2-х минут, фиксировалось ее местонахождение: развилка, ошибочный рукав, исходный рукав.

Согласно литературным данным [Orduna V., 2011] для того, чтобы мотивированность поиска пищи была одинакова для интактных крыс и крыс со СТЗ-индуцированным диабетом, депривация должна быть разной. В исследовании Orduna V. здоровые крысы при подготовке к тестированию в Тлабиринте должны были потерять 20% первоначальной массы, в то время как рацион крыс с диабетом на протяжении того же периода снижался до 75% от нормы. Авторы считают, что такая депривация приводит к одинаковой мотивированности животных на поиск пищи. Мнение же других авторов заключается в том, что крысы с СД перед тестированием в Т-образном лабиринте не нуждаются в снижении пищевого режима [Pechlivanova D., 2017], в то время как здоровые крысы могут подвергаться полной депривации

до 48 часов [Кравцова А.Н., 2016].

В нашем исследовании все группы животных были лишены пищи за 24 часа до тестирования в Т- и Y-образных лабиринтах. Таким образом, в связи с тем, что депривация для крыс без диабета (группы интакт и стеноз) была недостаточна, а для животных с диабетом (группы СД и СД+стеноз) чрезмерная, мы сравнивали данные группы отдельно друг от друга.

2.7.6. Оценка обучаемости и кратковременной пространственной памяти в лабиринте Барнс

Лабиринт Барнс представляет собой круглую арену диаметром 122 см, расположенную на подставке на высоте 113 см от уровня пола, с 18-ю отверстиями («ложнонорками») диаметром 9,5 см, расположенными по периметру. Под одним отверстием было убежище («норка») размером 11*30см. Лабиринт Барнс позволяет оценить обучаемость и кратковременную пространственную память грызунов [Rosenfeld C. S., 2014; Bazyar S. 2017]. Тестирование проводилось на протяжении 5-ти дней. При обучении (в 0 день) в том случае, если крыса в течение 5-ти минут не находила норку, ее мягко подталкивали.

2.7.7. Оценка физической работоспособности животных в тесте принудительного плавания с грузом

Тест принудительного плавания с грузом (5-6% массы тела) является моделью аэробной нагрузки [Зайцева М. С., 2015] и может свидетельствовать о физической работоспособности животных. Плавание проводили в пластиковых сосудах высотой 50см и диаметром 45 см при комнатной температуре. Стальной груз, составляющий 5±0,5% массы тела животного, прикрепляли резиновой лигатурой к корню хвоста крысы. Моментом окончания эксперимента считалось утомление животного в виде

неспособности всплыть на поверхность воды в течение 10 сек или отказ животного от плавания (погружение на дно более чем на 10 сек). Тестирование проводили в течение 3-х дней, фиксировали время плавания «до предела».

2.7.8. Оценка нарушений координации движений в тесте удержания на вращающемся стержне

Для оценки нарушений силы и координации животных использовали аппаратно-программный комплекс «Ротарод» (ООО «Нейроботикс», Россия), который представляет собой горизонтальный стержень (диаметр — 70 мм), разделенный на отсеки (ширина — 70 мм) вертикальными дисками (диаметр — 370 мм) в комплексе с датчиками и программным обеспечением для автоматической регистрации времени падения животных.

Через 37 дней после начала лечения животных обучали в тесте 3-х кратным помещением на стержень, на следующий день тест воспроизводили со скоростью вращения 10 оборотов в минуту. Регистрировали латентный период (ЛП) первого падения (время первого падения животного с вращающегося стержня) и суммарное время удержания на вращающемся стержне за 3 попытки [Bohlen M., 2009].

2.8. Оценка вазодилатирующей функции эндотелия

Изменение эндотелийзависимой вазодилатации оценивали по колебаниям церебрального кровотока при внутривенном введении ацетилхолина (Acros organics, США) в дозе 0,01 мг/кг - активатора выброса NO, и нитро-L-аргинина (Acros organics, США) в дозе 10 мг/кг - блокатора NO-синтаз. Регистрация кровотока осуществлялась после всех поведенческих тестов в проекции среднемозговой артерии с помощью полиграфа MP150 Biopac Systems, США), модуля для лазер-доплеровской флоуметрии LDF100C

(Biopac Systems, США) и программного обеспечения AcqKnowledge 4.2 (Biopac Systems, USA).

Введение модификаторов синтеза оксида азота осуществлялось после возвращения мозгового кровотока к исходному уровню [Тюренков И.Н., 2008], после чего регистрировали изменение скорости МК и вычисляли его изменение (в %) относительно исходного уровня.

Анализ степени изменения уровня МК при введении ацетилхолина и нитро-L-аргинина позволяет оценить стимулированную и базальную продукцию NO, а также установить степень нарушения вазодилатирующей функции эндотелия [Тюренков И. Н., 2008].

2.9. Морфометрическое исследование головного мозга

После введение животным хлоралгидрата (800 мг/кг внутривенно), крыс декапитировали и забирали образцы головного мозга, который фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, с дальнейшим обезвоживанием в батарее спиртов и изготовлением парафиновых блоков. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, тионином по методу Ниссля. Исследовали относительную плотность нейронов и сосудов микроциркуляторного русла в различных участках гиппокампа (СА1, СА3+СА4) и функциональных отделах коры головного мозга (моторной и соматосенсорной).

2.10. Статистическая обработка результатов исследования

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакетов следующих программ: Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, США), Prism 5 (GraphPad Software Inc., США). Для проверки распределения на нормальность использовали критерий Шапиро-Уилка. В зависимости от типа данных использовали следующие методы

статистического анализа: однофакторный дисперсионный анализ (One-Way ANOVA) либо ранговый однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с последующим применением апостериорных критериев - t критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони или критерия Дана. Статистически значимыми расценивались различия при p<0,05 [Гланц С., 1999; Реброва О. Ю., 2006.

ГЛАВА 3. КОГНИТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ, ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОГО НАРУШЕНИЯ МК НА ФОНЕ НИКОТИНАМИД-СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Установлено, что у пациентов с СД снижается внимание, скорость психомоторных реакций, речевая активность, способность к переключению и концептуальному мышлению [Мохорт Е. Г., 2014]. Сахарный диабет является основных этиологических факторов развития когнитивных нарушений [Емелин А. Ю., 2015]. Глюкозотоксичность, инсулинорезистентность возникающая эндотелиальная дисфункция усугубляют течение цереброваскулярной ускоряют развитие И нейродегенеративной патологий, наличие которых в свою очередь приводит к нарастающему снижению когнитивных функций [Crystal H. A., 2014; Z., Arvanitakis 2016]. Атеросклеротическое поражение сосудов, церебральную усугубляющее микроангиопатию, тоже приводит хроническому нарушению мозгового кровообращения и ускоряет снижение интеллектуальных функций. Таким образом, сосудистая мозговая недостаточность, и, как следствие, хроническое нарушение мозгового кровообращения, развивается совместно с нарушением углеводного обмена, и может являться основой для развития когнитивных нарушений [Мироненко M. O., 2013].

На данном этапе мы оценивали нарушения когнитивных функций у животных с хронической недостаточностью мозгового кровообращения и экспериментальным сахарным диабетом. Концентрацию глюкозы после 6-ти часовой депривации и при проведении перорального теста толерантности к глюкозе (ПТТГ) определяли на 14 и 28 дни эксперимента.

3.1. Оценка уровня гликемии у животных с хроническим нарушением мозгового кровообращения и экспериментальным сахарным диабетом

У экспериментальных животных через 3 дня после моделирования СД наблюдалось значительное повышение уровня глюкозы крови через 2 часа после глюкозной нагрузки, в эксперимент отбирались животные с уровнем гликемии в пределах 11-19 ммоль/л, которые в соответствии с принципом рандомизации распределялись по группам. До начала лечения средний уровень глюкозы крови в группах с СД составлял 15,2 - 18,7 ммоль/л, что значительно превышало таковой у интактных животных (4,8 ммоль/л).

Наиболее информативным методом оценки утилизации глюкозы является глюкозотолерантный тест (ПТТГ), позволяющий выявить нарушения углеводного обмена [Bowe J. E., 2014]. Через 14 дней после начала лечения в ходе проведения ПТТГ уровень гликемии в группе животных с СД и нормальным мозговым кровообращением через 30 минут после введения глюкозы повысился на 112% и спустя 2 часа оставался на высоком уровне (9,8 ммоль/л), превышая исходный на 11% (табл. 2). В группе комбинированной патологии СД+стеноз уровень глюкозы через 30 минут повысился на 152% и спустя 2 часа превышал исходный на 38% (р<0,05).

При проведении ПТТГ через 28 дней после начала лечения в группах без лечения также наблюдалось выраженное нарушение толерантности к глюкозе: через 30 минут после глюкозной нагрузки уровень гликемии поднялся на 174% у животных с комбинированной патологией СД+стеноз и на 130% у животных с СД и нормальным МК (по сравнению с исходным). Через 2 часа после глюкозной нагрузки уровень глюкозы крови оставался достаточно высоким, превышая исходный на 35,7% и 17,3% в группах СД и СД+стеноз соответственно. Необходимо отметить, что комбинированная патология — ЭСД на фоне ХНМК (СД+стеноз) отягощает нарушение углеводного обмена (толерантность к глюкозе повышается больше) по сравнению с СД и нормальным мозговым кровообращением.

Таблица 2. Уровень глюкозы в крови у животных с СД и комбинированной патологией (СД+стеноз), не получавших лечение, при проведении ПТТГ на 14 и 28 дни эксперимента, ммоль/л

	0 день	14 день эксперимента				28 день эксперимента			
		Перед ПТТГ, 0 мин	30	60 мин	120 мин	Перед ПТТГ, 0 мин	30 мин	60 мин	120 мин
Интакт	4,8± 0,2	4,8± 0,2	5,0± 0,1	5,1± 0,1	4,8±0, 1	4,7± 0,2	5,1±0,1	5,2±0,1	4,9±0,1
СД	18,3± 2,1*	9,1± 2,0*	17,6 ± 3,9*	13,5 ± 3,2*	9,8± 2,3*	8,3± 2,3*	19,0± 3,2*	15,6± 2,5*	10,0± 2,0*
СД+ стеноз	17,8± 0,9*	9,0± 2,3*	18,3 ± 2,1*	19,5 ± 2,3*	11,2± 2,4*	8,6± 0,9*	18,4± 2,2*	15,5± 1,4*	10,1± 1,2*

Примечание. * - различия достоверны относительно группы Интакт при $p{<}0{,}05$

При анализе площади под кривой «уровень гликемии-время» (AUC_{0-120} , ммоль/л*мин) было отмечено, что уровень AUC_{0-120} в группе комбинированной патологии снизился к 28 дню по сравнению с 14-м на 12%, тогда как у животных с СД и нормальным МК наблюдался прирост на 8% (что, впрочем, не было статистически значимо).

3.2. Оценка когнитивного дефицита в тестах УРПИ и ТЭИ

При воспроизведении теста УРПИ (рис. 3A) на 29-й день только интактные животные не заходили в темный отсек, тогда как в остальных группах латентный период был значительно ниже (в группе СД+стеноз почти в два раза) по сравнению с контрольной группой. При воспроизведении теста через 24 часа после обучения, у животных с комбинированной патологией латентный период захода в темный отсек составил в среднем 120 секунд, что является минимальным значением среди всех групп, и свидетельствует о значительном угасании памятного следа или недостаточном закреплении информации в памяти животных. Кроме того, в тесте УРПИ в группе

СД+стеноз было наибольшее количество животных, зашедших в темный отсек, как через 24 часа после обучения (33%), так и через 2 недели (56%) (рис. 3А). У крыс с сахарным диабетом тоже наблюдалось нарушение закрепления условной реакции пассивного избегания, хотя и не такое значительное, как в группе со стенозом ОСА. Животные с комбинированной патологией СД+стеноз решали задачу экстраполяционного избавления (рис. 3Б) дольше чем в других группах (по сравнению с интактными крысами почти в два раза), что свидетельствует о слабом запоминании эффективной стратегии поведения избавления. Латентный период подныривания в группе комбинированной патологии тоже был наибольшим как при обучении, так и во время обоих воспроизведений (через 24 часа и через 2 недели) - почти в два раза по сравнению с контрольной группой, что может говорить не только о нарушении памяти, но и снижении двигательной активности. В группе интактных животных время избавления от аверсивной среды во втором воспроизведении было ниже, чем в первом (в среднем на 5 секунд), однако у всех животных с патологиями ЛП подныривания через 2 недели после обучения был больше, чем через 24 часа, а наибольшая разница наблюдалась в группе комбинированной патологии. Увеличение времени решения задачи экстраполяционного избавления как у крыс с СД (незначительное), так и с нарушением мозгового кровообращения и особенно с комбинированной патологией через 2 недели после обучения свидетельствует о нарушении закрепления памяти о способе избавления от аверсивной среды. Крысы с СД без кровообращения ТЭИ нарушения мозгового тесте тоже демонстрировали затухание памятного следа, однако не настолько существенно, как животные со стенозом ОСА.

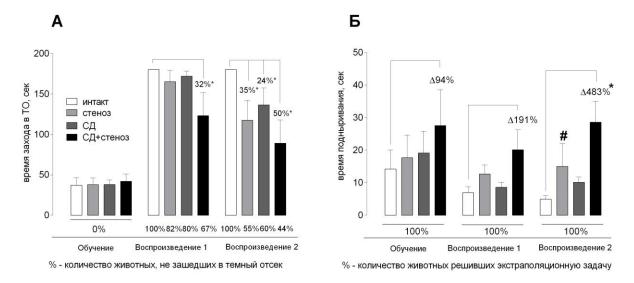


рис. 3. Поведение животных со стенозом ОСА, СД и комбинированной патологией в тестах УРПИ и ТЭИ A) Время захода в темный отсек в тесте УРПИ; E) Латентный период подныривания в тесте ТЭИ. *— различия достоверны относительно группы интакт при E0,05; # - E0,080 относительно группы интакт.

3.3. Оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в тесте Открытое поле.

В тесте Открытое поле (рис. 4) двигательная активность снизилась к 29-му дню во всех группах, но более значительная разница между 16-м и 29-м днем наблюдалась у животных с СД (как со стенозом, так и без него). У крыс с СД и нормальным мозговым кровообращением хотя на 16-й день двигательная активность и была выше, чем в других группах, к 29-му дню значительно снизилась, и практически не отличалась от животных со стенозом ОСА. Ориентировочно-исследовательская активность к концу эксперимента выросла только у интактных животных, а наибольшее снижение отмечалось у животных со стенозом ОСА (как с комбинированной патологией, так и без диабета). В целом, и двигательная, и ориентировочно-исследовательская активность у животных с патологией СД+стеноз были наименьшие из всех групп (отклонения от интакта составил 60%, от ХНМК –

39%, от СД – 34%). Разница в показателе ОИА между 16-м и 29-м днями эксперимента была наибольшая в обеих группах с нарушением мозгового кровообращения, что может свидетельствовать об угасании реакции на новизну и растущей апатии животных.

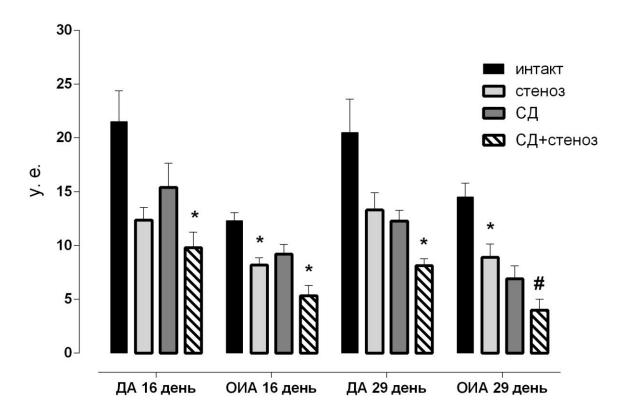


рис. 4. Поведение животных со стенозом ОСА, СД и комбинированной патологией в тесте Открытое поле. Примечание: ДA - двигательная активность, OUA - ориентировочно-исследовательская активность. * - различия достоверны относительно группы интакт при p < 0.05; # - различия достоверны относительно групп интакт и СД при p < 0.05

3.4. Оценка тактильной чувствительности и мелкой моторики в адгезивном тесте

При проведении адгезивного теста (рис. 5) в группе комбинированной патологии наблюдалось наибольшее количество животных, не снявших пластырь, как с 1 лапы, так и с двух (рис. 5Б). Латентный период обнаружения и время, затраченное на избавление от клейкой ленты (рис. 5А) как на 16-й, так и на 29-й день в группе СД+стеноз тоже было максимально

среди всех животных: так, не сняли пластырь с одной лапы 56% на 16 день и 67% на 29 день, с двух лап - 44% и 56% на 16 день и 29 день соответственно, что говорит о значительном снижении тактильной чувствительности. Тогда как данные показатели у интактных крыс практически не отличались при двух проведениях тестов, в других группах наблюдалось увеличение и ЛП, и времени снятия пластыря, что свидетельствует о прогрессирующем нарушении чувствительности и мелкой моторики, а также о нарушении в работе нервной системы.

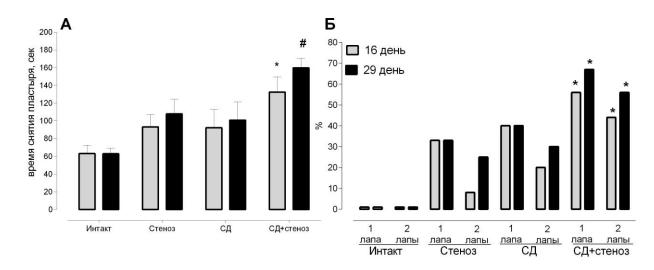


рис. 5. Результаты адгезивного теста у крыс со стенозом ОСА, СД и комбинированной патологией. А) Время снятия пластыря * - различия достоверны относительно группы интакт при р <0,05; # - различия достоверны относительно группы интакт при р <0,01 Б) Количество животных (%) не снявших пластырь, с одной (1) или с двух (2) лап. * - различия достоверны относительно группы интакт при р <0,01.

3.5. Оценка защитного поведения в тесте "закапывание стеклянных шариков"

Тест закапывания стеклянных шариков (marble test) традиционно рассматривается как модель обсессивно-компульствного расстройства, но может также отражать уровень тревожности животных [Albelda N., 2012].

В тесте закапывания стеклянных шариков на 16-й день после начала лечения в группе комбинированной патологии СД+стеноз наблюдалось наибольшее число нетронутых шариков (оставшихся на месте) и наименьшее

число шариков, сдвинутых с первоначального места (рис. 6). На 29 день показатели мало отличались между группами (наибольшее различие в количестве шариков, закопанных более чем на 2/3, было у животных с СД по сравнению с интактом, p=0,10, что, впрочем, говорит лишь о тенденции, но не о статистической значимости). К 29 дню эксперимента в группе с нарушением МК без диабета увеличилось число нетронутых шариков (почти на 50%, p=0,230), и снизилось количество шариков, сдвинутых с места (на 20%), что свидетельствует о снижении двигательной активности и защитного поведения. Кроме того, у животных с СД и ХНМК может страдать психоэмоциональное состояние, что проявляется возникновением обсессий (навязчивых мыслей) и компульсий (навязчивое поведение), направленных на снижение тревоги.

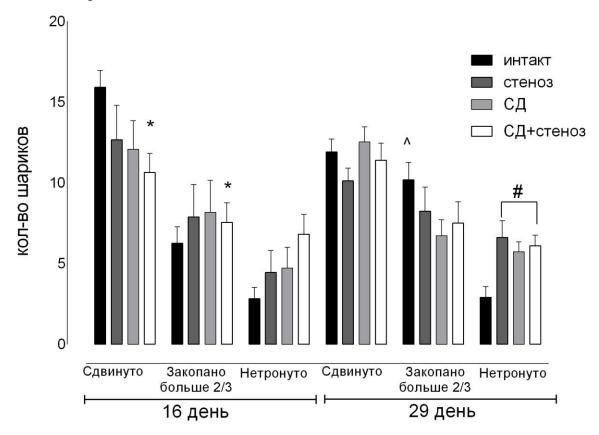


рис. 6. Результаты теста «закапывание стеклянных шариков» у крыс со стенозом ОСА, СД и комбинированной патологией. * - различия достоверны относительно группы интакт (16 день) при p < 0.05; # - различия достоверны относительно группы интакт (29 день) при p < 0.05; $^{\wedge}$ - различие достоверно относительно группы интакт (16 день) при p < 0.05

3.6. Оценка моторного дефицита в тестах Ротарод и принудительное плавание

О низкой двигательной активности животных с комбинированной патологией говорят и результаты тестов Ротарод (рис. 7А) и принудительное плавание с грузом (рис. 7Б). У этой группы время удержания на вращающемся стержне (суммарное за три попытки) и нахождения на поверхности было воды минимальным, причем время плавания последовательно снижалось В течение трех дней тестирования. Выносливость крыс с СД тоже уменьшилась к 3-му дню (в отличие от группы стеноза), что может свидетельствовать о постепенном истощении этих животных.

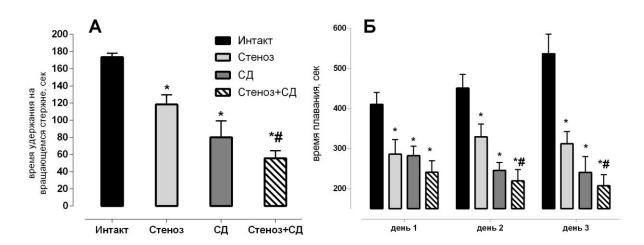


рис. 7. Результаты оценки моторных функций крыс со стенозом ОСА, СД и комбинированной патологией. А) Время удержания на вращающемся стержне в тесте Ротарод. * -различия достоверны относительно группы интакт при p < 0.05, # - - различия достоверны относительно группы Стеноз при p < 0.05. Б) Время плавания с грузом. * -различия достоверны относительно группы интакт при p < 0.05, # - различия достоверны относительно группы Стеноз при p < 0.05.

3.7. Оценка обучаемости и рабочей памяти в Т- и Y-образных лабиринтах

В Т-образном лабиринте в группе интакта количество животных, нашедших приманку, было почти в 2 раза больше по сравнению с группой стеноза как во время первой серии тестирования (17-19 дни), так и на 30-32 дни эксперимента (рис. 8). В группе комбинированной патологии по сравнению с животными с СД количество крыс, хотя бы один раз нашедших кормушку за 10 попыток, на 17-19 дни было незначительно больше (статистически не достоверно), однако через 2 недели их доля снизилась на 25% (тогда как в группе СД наблюдался рост данного показателя на 43%) и стало значительно меньше по сравнению с животными без нарушения мозгового кровообращения (% отклонения от группы «СД» составил 59%). Данное снижение доли животных, нашедших приманку как в Т-образном лабиринте, так и в Y-образном. может говорить о нарушении долговременной комбинированной памяти при патологии.

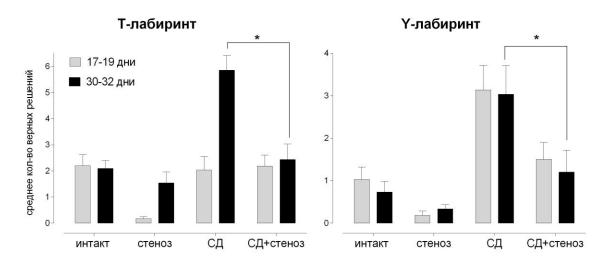


рис. 8. Среднее количество верных решений (выбор подкрепляемого рукава) при тестировании животных со стенозом ОСА, СД и комбинированной патологией в Т- и Y-образных лабиринтах. Примечание: * - различия достоверны при p<0,05

Среднее время подхода к кормушке в Т-образном лабиринте к концу эксперимента больше всего снизилось у интактных животных (на 67 %), в то

время как в группе стеноза оно выросло. Хотя в группе с ХНМК среднее время подхода к кормушке к концу эксперимента увеличилось на 56% (p<0,05) эти животные реже покидали свой рукав и чаще возвращались в него из развилки, а также делали меньше верных решений, что говорит о нежелании делать выбор, апатии и заторможенности. Кроме того, увеличение времени подхода к кормушке у крыс со стенозом к концу эксперимента может говорить и о снижении двигательной активности. Количество ошибок (рис. 9A) было во всех группах примерно одинаково и везде достоверно снизилось к 30 дню (p<0,05).

Животные с ХНМК (как с диабетом, так и без него) к концу эксперимента чаще оставались в развилке и в своем рукаве, либо возвращались в него по окончании 2-х минутного периода (рис. 9Б), что может свидетельствовать о прогрессирующей апатии, заторможенности и нежелании принимать решение. Животные со стенозом без диабета при первой серии тестирования чаще всех оставались в своем рукаве (% отклонения от интакта составил 53%), что может говорить о нежелании исследовать лабиринт в связи с низкой исследовательской и двигательной активностью. К концу эксперимента этот показатель вырос у всех групп, причем как в Т- образном, так и в Ү-образном лабиринте, однако наибольший прирост наблюдался у интактных животных (в Т-лабиринте в 2 раза, в Үлабиринте – на 36%), что может говорить о габитуации к условиям тестирования и хорошей долговременной памяти: здоровые крысы после 2 лабиринт, недельного перерыва «помнили» a чувство было голода недостаточно для подхода к кормушке.

Среднее время, проведенное в развилке, было максимально в группе комбинированной патологии (на 66% больше СД), и эти животное чаще всех оставались в развилке и не принимали никакого решения. Животные со стенозом ОСА без диабета в развилке времени проводили меньше других (% отклонения от интакта составил 52%), однако если при первой серии тестирования (17-19 дни) они либо совершали ошибку, либо возвращались в

свой рукав из развилки, то к концу эксперимента эти животные либо возвращались в свой рукав, либо оставались в развилке и не принимали никакого решения. Животные группы СД+стеноз на 17 день эксперимента чаще совершали ошибку, выбирая неправильный рукав, а на 30 день либо оставались в развилке, либо возвращались в свой рукав или даже не покидали его. Данный факт может свидетельствовать о прогрессирующей апатии и заторможенности крыс с комбинированной патологией и нежелании принимать какое-либо решение.

В целом, животные с нарушением мозгового кровообращения, как с СД, так и без него, делали правильный выбор реже других групп на протяжении всех 6-ти дней тестирования, и если количество ошибочных решений мало отличалось между группами, то крысы со стенозом ОСА реже принимали решение, оставаясь в развилке, или даже отказывались его принимать, возвращаясь в свой рукав.

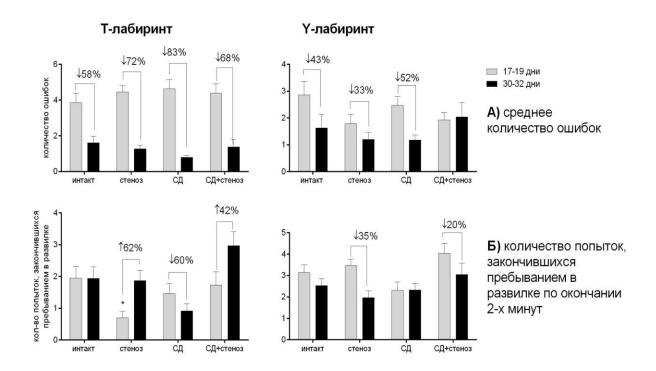


рис. 9. Количество ошибок (A) и количество попыток, закончившихся пребыванием в развилке (Б) при тестировании животных со стенозом ОСА, СД и комбинированной патологией в Т- и Y-образных лабиринтах. Примечание: * - различия достоверны при p < 0.05

При тестировании в Y-образном лабиринте показатели в целом мало отличались от Т-лабиринта, но тем не менее некоторые отличия следует отметить.

Во время первой серии тестирования (17-19 дни) количество животных, нашедших кормушку, в группе СД+стеноз незначительно отличалось от животных с диабетом без стеноза, однако к концу эксперимента их доля снизилась на 60% (рис. 8), что свидетельствует о прогрессирующем нарушении памяти и обучаемости. Эти животные чаще других оставались в своем рукаве и отказывались его покидать, что может говорить о прогрессирующей апатии и заторможенности крыс с нарушением мозгового кровообращения на фоне СД.

Среднее время подхода к кормушке в Y-образном лабиринте к 30 дню снизилось практически во всех группах аналогично Т-лабиринту, однако если в Т-образном лабиринте данный показатель у животных со стенозом ОСА к концу эксперимента вырос более чем на 50%, в Y-лабиринте он остался без изменений.

Среднее количество ошибок (рис. 9A) К концу эксперимента уменьшилось во всех группах (% снижения в группе интакта составил 43%, в группе СД - 52%), так же как в Т-лабиринте, однако у животных с комбинированной патологией оно осталось без изменений. Тем не менее, если в Т-образном лабиринте крысы с СД и стенозом ОСА на 17-й день делали в среднем за 10 попыток 4,5 ошибки, к концу эксперимента только 1,5. Ү-образном лабиринте животные с комбинированной патологией совершали почти одинаковое количество ошибок при обеих сериях тестирования - в среднем 1,75. Таким образом, число ошибок к концу эксперимента в этой группе мало отличалось между лабиринтами, хотя в Тлабиринте изначально было выше. Животные с ХНМК как с диабетом, так и без него, на 17-й день эксперимента делали меньше ошибок по сравнению с крысами с нормальным кровообращением, но процент снижения к 30 дню у них был ниже: менее 33% у животных со стенозом ОСА без СД, тогда как в

группах сравнения он составил 42% у интактных и 52% у крыс с СД. Данный факт может объясняться изначально сниженной двигательной активностью животных с ХНМК по сравнению с крысами без нарушения мозгового кровообращения (группы интакт и СД).

В целом, количество ошибок во всех группах к концу эксперимента между лабиринтами мало отличалось, однако в начале тестирования в Тобразном лабиринте все животные делали больше ошибок, чем в Улабиринте. Данный факт, возможно, объясняется тем, что Толабиринт представляет собой темный, закрытый коридор, с непрозрачными стенками и с резким поворотом в развилке, тогда как в Улабиринте животные могли видеть приманку через прозрачные стенки.

Крысы со стенозом ОСА без СД чаще других оставались в своем рукаве, либо возвращались в него на протяжении всех дней тестирования (так же, как и в Т-лабиринте), что может говорить о сниженной двигательной активности, пассивности и апатии. У группы с комбинированной патологией данный показатель был также выше группы сравнения (СД).

Время, проведенное в развилке, в Y-образном лабиринте во все дни тестирования было максимально в группе комбинированной патологии (также, как и в Т-лабиринте) и мало отличалось между сериями (17-19 и 30-32 дни), однако эти животные и чаще оставались в развилке по окончании 2-х минут, то есть "отказывались" принимать какое-либо решение. Крысы со стенозом ОСА при обеих сериях тестирования в развилке времени проводили меньше всех, как и в Т-лабиринте (% отклонения от интакта составил 31%). Количество ошибок как на 17, так и на 30 дни, у них было минимально, однако если при первой серии тестирования (17-19 дни) они чаще оставались в развилке по окончании 2-х минут, то к концу эксперимента чаще возвращались в свой рукав.

В целом, животные со стенозом ОСА, как с СД, так и без него, в Уобразном лабиринте делали правильный выбор реже других групп на протяжении всех 6-ти дней тестирования (рис. 8), аналогично результатам,

продемонстрированным в Т-лабиринте. Таким образом, Т-образный лабиринт в большей степени отражает динамику процесса нарушения когнитивных функций у крыс с недостаточностью мозгового кровообращения.

3.8. Оценка обучаемости и кратковременной пространственной памяти в лабиринте Барнс

В лабиринте Барнс среднее время нахождения норки как на 2-й день (первый день воспроизведения), так и на протяжении как всех 5-ти дней тестирования, было максимально в группе комбинированной патологии (рис. 10А). Количество ошибок как на 2-й день (рис. 10Б), так и на протяжении всех 5-ти дней тестирования было максимально в группах стеноза и СД+стеноз. На 3-й день тестирования только животные групп интакта и СД все (100%) смогли найти норку в течение 5-ти минут (рис. 10В), в то время как почти четверть крыс с нарушенным мозговым кровообращением найти норку не смогли ни разу (хотя эти данные статистически не достоверны). В целом, здоровые животные находили норку быстрее и совершали ошибок меньше, по сравнению с другими группами. Крысы с СД и нормальным кровообращением (группа СД) мозговым занимали "промежуточное положение" между интактными животными и животными со стенозом ОСА: время нахождения норки и количество ошибок у них было больше здоровых крыс, но меньше, чем в группах «стеноз» и «СД+стеноз».

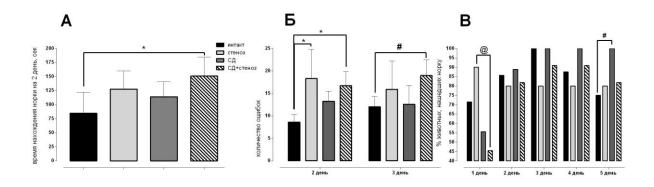


Рис. 10. Результаты тестирования в лабиринте Барнс крыс со стенозом **ОСА, СД и комбинированной патологией.** А) Среднее время нахождения норки на 2-й день тестирования. * - p<0,05. Б) Количество ошибок на 2 и 3 дни тестирования. * - p<0,05; # - p=0,143. В) Доля животных (%), нашедших норку в течение 5-ти минут. @ - p=0,329; # - p=0,357 (критерий хиквадрат)

Заключение

В данном исследовании экспериментальный сахарный диабет, индуцированный введением никотинамида-стрептозотацина, при отсутствии лечения спустя 28 дней приводил к выраженным двигательным и сенсорномоторным нарушениям. Хроническое нарушение мозгового кровообращения вызывало более выраженные нарушения, а сочетанная патология (СД+стеноз) – еще более тяжелые расстройства. У этих животных как на 16, так и на 29 день эксперимента наблюдались меньшая двигательная и локомоторная активность, сниженное исследовательское поведение, выраженное нарушение тактильной чувствительности. При тестировании в лабиринтах выявлялись достоверные признаки когнитивного дефицита, проявляющиеся нарушением обучаемости, памяти, развитием апатии, снижением скорости принятия решения к действию и скорости ее исполнения.

В нашем исследовании нарушение поведенческих функций в лабиринтах крыс с СД без нарушения мозгового кровообращения было не так значительно, как в группах со стенозом ОСА. Данный факт подтверждается информацией о том, что снижение интеллекта у больных СД 2 типа чаще

бывает легким или умеренным [Левин О. С., 2015], но не тяжелым. мозгового кровообращения Хроническое нарушение вызывает более выраженные психоневрологические нарушения, а сочетанная патология (ХНМК и СД) – тяжелые нарушения. Данный дефицит может быть связан с усугубляющемся прогрессированием сахарного диабета, течением и кровообращения, дисфункцией нарушением мозгового эндотелия, оксидативным стрессом. Поэтому на следующем этапе мы оценивали эффективность фармакологической коррекции психоневрологических нарушений при комбинированной патологии.

ГЛАВА 4. КОРРЕКЦИЯ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ У КРЫС С ХРОНИЧЕСКОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ НОВЫМ АГОНИСТОМ GPR119 И ЕГО КОМБИНАЦИЯМИ

Инсулинорезистентность, гипергликемия, дислипидемия при сахарном диабете ускоряют атерогенез посредством индуцирования вазоконстрикции, воспаления и тромбоза сосудов, нарушения микроциркуляции, снижения синтеза оксида азота (NO), что приводит к нарушению эндотелийзависимой антитротботической, противовоспалительной вазодилатации, функции [Кошкарбаева А. К., 2013]. Развивающаяся сосудов эндотелиальная дисфункция, проявляющаяся в нарушении вазомоторной, тромбофилической, адгезивной и ангиогенной функциях эндотелия [Мельникова Ю. С., 2015], также может привести к развитию атеросклероза, нарушению ГЭБ и функции головного мозга [van Sloten T. T., 2017]. Окислительный стресс способствует перекисному окислению липидов и фосфолипидов стенки сосудов, что сопровождается изменением их структуры и физико-химических свойств. Повышенное окисление частиц ЛПНП приводит к нарушению сосудистой функции, вазоконстрикции и усилению пролиферации гладкомышечных клеток сосудистой стенки [Кошкарбаева А. К., 2013]. Стенозирующий процесс при атеросклерозе вызывает нарушение мозгового кровообращения и ухудшение когнитивных функций, причем уровень снижения интеллекта напрямую определяется степенью стеноза [Хасанова Д. P., вызывающего хроническое нарушение мозгового кровообращения. Эти две патологии – сахарный диабет и ХНМК – формируются и развиваются параллельно, и обе приводят к нарушению когнитивных функций у пациентов [Гацких И. В, 2015].

Необходимо отметить, что независимо от того, насколько эффективно лечение, познавательные функции больных СД тем не менее будут

постепенно снижаться. Во-первых, хороший контроль уровня глюкозы крови, который не всегда возможно достичь, не гарантирует сохранность когнитивных функций. Помимо этого, инсулинорезистентноть, меняющая метаболизм β-амилоида, может привести к развитию нейродегенерации и усугублению интеллектуальных нарушений. Эндотелиальная дисфункция и оксидативный стресс, снижая вазодилятацию, изменяя систему гемостаза, могут также инициировать процесс нейродегенерации и вызвать хроническое нарушение мозгового кровообращения.

В этом случае возможным решением являются лекарственные препараты, обладающие поливалентным действием. Такими качествами обладают средства, влияющие на систему инкретинов. Помимо метаболических эффектов (гипогликемическое глюкозозависимое действие), инкретиномиметики имеют ряд плейотропных эффектов, в том числе нейропротекторный, что связано с широким распространением рецептора к глюкагон-подобному пептиду-1 (ГПП-1) во многих органах и тканях [Tramutola A., 2016]. Экспериментальные работы последних лет говорят о способности аналогов ГПП-1 оказывать нейропротективное действие при нарушении мозгового кровообращения [Власов Т. Д., 2016; Anagnostis, 2011]. В настоящее время на рынке представлены 2 группы препаратов с ГПП-1, имитирующие инкретиновой активностью: аналоги действие глюкагнподобного пептида-1, и ингибиторы ДПП-4, пролонгирующие действие эндогенного ГПП-1. Новой и высокопотенциальной группой являются агонисты GPR119, повышающие уровни циркулирующих ГПП-1, ГИП и пептида тирозин-тирозина (РҮҮ), который, по некоторым данным, связан с когнитивными функциями и нарушениями поведения [Stadlbauer U., 2013; Nunez D. J., 2014].

В нашем исследовании, животные со никотинамид-стрептозотоцининдуцированным СД и ХНМК в течение 4 недель получали агонист GPR119, соединение ZB-16, в качестве гипогликемической терапии, или препараты сравнения: метформин и ситаглиптин, а также их комбинации. Через 14 и 28 дней после начала лечения проводили ПТТГ и оценку психоневрологических показателей.

4.1. Оценка влияния соединения ZB-16 на уровень гликемии у животных с хроническим нарушением мозгового кровообращения и экспериментальным сахарным диабетом

Терапевтическое введение агониста GPR119 в течение 4 недель привело к снижению уровня глюкозы в крови после 6-ти часовой депривации: в группе ZB-16 на 24% и 27% по сравнению с группами животных с ЭСД и XHMK+ЭСД, соответственно, в комбинации с метформином – на 33 и 35% по сравнению с группами СД и СД+стеноз соответственно (табл. 3). Максимальное отличие было зафиксировано в группах ZB+метформин и метформин+ситаглиптин: через 30 минут после нагрузки глюкозы уровень гликемии отличался от контрольной группы на 46% и 48% соответственно, а через 120 минут - на 49% и 52% для групп ZB+метформин и метформин+ситаглиптин соответственно (р<0,05). Следует отметить, что значимой разницы в исходном уровне гликемии (до введения глюкозы) между группами не наблюдалось, хотя у животных, получавших комбинацию ZB-16+метформин уровень гликемии был меньше контроля на 32% и 35% на 14 и 28 день соответственно.

У животных с СД и ХНМК, получавших гипогликемическую терапию в течение 28 дней, при проведении ПТТГ наблюдался статистически значимый менее выраженный рост гликемии и меньший ее уровень через 2 часа после глюкозной нагрузки, а также меньшая площадь под кривой «уровень гликемии-время» по сравнению с контрольной группой (табл. 3). Наибольшее отличие от контрольной группы было зафиксировано в группах, получающих ZB-16 в комбинации с метформином, а также метформин с ситаглиптином: через 30 минут после нагрузки глюкозы уровень гликемии отличался от группы СД+стеноз на 57% для обеих групп, а через 120 минут - на 41% и 44% для групп ZB+метформин и метформин+ситаглиптин соответственно (28

день, p<0,05).

Таблица 3. Уровень глюкозы в крови при проведении ПТТГ на 14 и 28 дни эксперимента у крыс с ХНМК и ЭСД, получавших лечение, ммоль/л

	0 день	14 день лечения						
	(до начала лечения)	Перед ПТТГ, 0 мин	30 мин	60 мин	120 мин			
Интакт	4,8±0,2	4,8±0,2	5,0±0,1	5,1±0,1	4,8±0,1			
СД+стеноз	17,8±0,9*	9,0±2,3*	18,3±2,1*	19,5±2,3*	11,2±2,4*			
ZB-16	18,1±1,3*	7,4±0,7	13,3±1,0#	12,8±1,5	8,0±0,5			
метформин	17,5±1,4*	6,9±0,6	11,8±1,0#	11,1±1,0	7,5±0,4			
ситаглиптин	17,7±1,6*	7,7±1,0	14,1±2,1	11,7±1,7	8,1±1,4			
ZB-16+ метформин	17,9±1,6*	6,1±0,7	9,9±0,9	8,7±0,7	6,4±0,5			
ZB-16+ ситаглиптин	17,5±1,7*	7,5±1,2	14,5±3,0#	12,5±2,7	7,9±1,2			
Метформин+ ситаглиптин	17,8±1,6*	5,7±0,7	9,5±0,8	8,1±1,0	6,2±0,4			
28 день лечения								
		Перед ПТТГ, 0 мин	30 мин	60 мин	120 мин			
Интакт		4,7±0,2	5,1±0,1	5,2±0,1	4,9±0,1			
СД+стеноз		8,6±0,9*	18,4±2,2	15,5±1,4	10,1±1,2			
ZB-16		6,3±0,4	13,5±2,7#	9,9±1,5#	7,0±0,5			
метформин		5,7±0,5	10,9±1,8#	8,6±1,4#	6,7±1,1			
ситаглиптин		6,5±0,7	12,5±1,6	11,1±2,0#	7,3±1,0			
ZB-16+		5,6±0,4	7,9±0,5#	6,8±0,2#	6,0±0,4			
метформин ZB-16+		6,6±0,8	13,4±3,3	10,0±1,7#	6,8±0,7			
ситаглиптин Метформин+ ситаглиптин		5,4±0,6	7,9±0,8#	7,0±0,7#	5,7±0,5			

Примечание. * - различия достоверны относительно группы Интакт (p<0,05), # - различия достоверны относительно группы СД+стеноз (p<0,05)

При анализе площади под кривой «уровень гликемии-время» (AUC_{0-120} , ммоль/л*мин) было отмечено, что уровень AUC_{0-120} через 14 и 28 дней после начала лечения в опытных группах была значимо ниже по сравнению с контрольной (рис. 11), максимальное отклонение наблюдалось в группах, получавших ZB+метформин (49% на 14 день и 52% на 28 день) и метфомин+ситаглиптин (отклонение составило 52% на 14 и 28 день). Однако между собой лечебные группы по показателю AUC_{0-120} отличались незначительно.

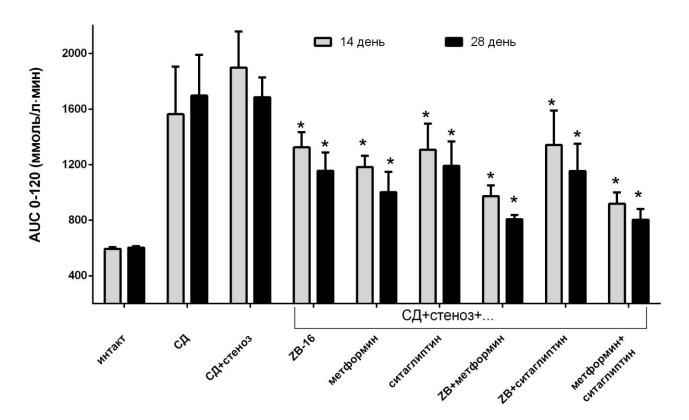


рис. 11. Площадь под кривой «уровень гликемии-время» (AUC₀₋₁₂₀) при проведении ПТТГ на 14 и 28 дни. * - различия достоверны относительно группы СД+стеноз при p<0,05

Таким образом, соединение ZB-16 как в монотерапии, так и в комбинации с метформином и ситаглиптином, улучшало толерантность к глюкозе, выражающуюся в меньшей величине пика роста гликемии и меньшем ее уровне через 2 часа после глюкозной нагрузки. Комбинация ZB-16+метформин более других потенциировала гипогликемический эффект,

тогда как комбинация ZB-16+ситаглиптин не имела преимуществ перед влиянием отдельных веществ на утилизацию глюкозы.

4.2. Коррекция когнитивных нарушений у крыс с хроническим нарушением мозгового кровообращения и экспериментальным сахарным диабетом соединением ZB-16, метформином, ситаглиптином и их комбинациями

4.2.1. Оценка когнитивного дефицита в тестах ТЭИ и УРПИ

При воспроизведении теста УРПИ (рис. 12) животные контрольной группы быстрее заходили в темный отсек как на 16-й, так и на 29-й дни, тогда как в группах, получавших соединение ZB-16, метформин, и особенно их комбинацию и комбинацию с ситаглиптином, наблюдалось увеличение латентного периода захода в ТО, что может говорить о закреплении памятного следа. Кроме того, в тесте УРПИ в контрольной группе было наибольшее количество животных, зашедших в темный отсек как через 24 часа после обучения (33%), так и через 2 недели (56%), в то время как крысы, получавшие комбинированную терапию ZB+метформин, реже покидали светлую часть камеры (22%, p=0,146), что может свидетельствовать о информации в закреплению памяти животного. тестировании животных, получавших соединение ZB-16 в комбинации с ситаглиптином, в установке УРПИ при воспроизведении через 29 дней латентный период захода в темный отсек был наибольшим и достоверно 68%. отличался ОТ контрольной группы на что тэжом также свидетельствовать о хорошем закреплении информации в памяти животного.

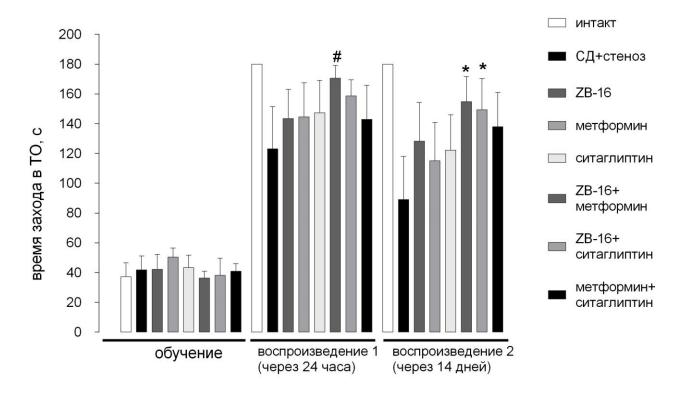


рис. 12. Латентный период захода в ТО в тесте УРПИ у крыс с ХНМК и СД, получавших лечение. Примечание: Воспроизведение 1 — через 24 часа после обучения (16 день эксперимента), Воспроизведение 2 — 29 день эксперимента (через 2 недели после обучения, 29 день эксперимента); # - p=0,0610 относительно группы СД+стеноз; * - p<0,05 относительно группы СД+стеноз.

В тесте экстраполяционного избавления (рис. 13) при обучении и первом воспроизведении через 24 часа различия между животными, получавшими лечение, и контрольной группой были недостоверны, однако при втором воспроизведении теста через 14 дней ЛП подныривания у животных, получавших соединение ZB-16 и ситаглиптин, был меньше, чем у получавших контрольной группы (p=0.0519),a животных, крыс V комбинированную терапию ZB-16+метформин и метформин+ситаглиптин достоверно выше контроля, что может говорить о тенденции к снижению времени решения экстраполяционной задачи и закреплению условной реакции избавления от аверсивной среды в памяти животных.

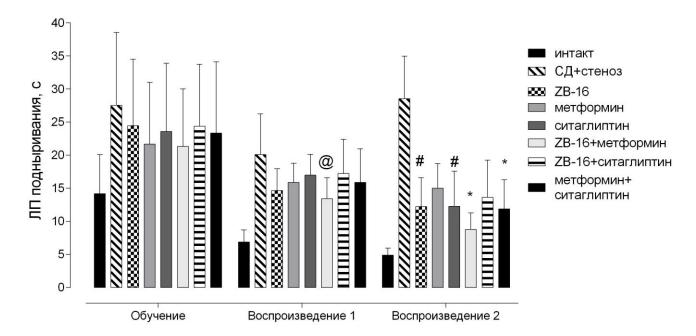


рис. 13. Латентный период подныривания в тесте ТЭИ у крыс с ХНМК и СД, получавших лечение. Примечание: Воспроизведение 1 — через 24 часа после обучения (16 день эксперимента), Воспроизведение 2 — 29 день эксперимента (через 2 недели после обучения, 29 день эксперимента); @ - p=0,1741 относительно группы СД+стеноз; # - p=0,0519 относительно группы СД+стеноз.

4.2.2. Оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активности в тесте «Открытое поле»

В тесте Открытое поле (рис. 14) статистически значимая разница между 29 группами появилась на день терапии, когда двигательная ориентировочно-исследовательская активность животных, получавших комбинированное лечение соединением ZB-16 и метформином стала существенно выше контрольной группы. Кроме того, оба вида активности в контрольной группе и группе, получавшей метфоромин, снизились к концу эксперимента (на 17% и 25% в группе СД+стеноз, на 12% и 7% в группе «метформин» двигательная и ориентировочно-исследовательская активность соответственно). В то же время у животных, получавших соединение ZB-16 и его комбинацию с метформином данные показатели выросли (на 5% и 31% в группе ZB-16, на 15% и 20% в группе комбинированной терапии, двигательная и ориентировочно-исследовательская активность соответственно). Следует отметить, что терапия ситаглиптином не оказывала влияния ни на двигательную, ни на ориентировочно-исследовательская активность. Снижение активности в группе с нарушением мозгового кровообращения и СД свидетельствует об угасании реакции на новизну и растущей апатии животных, которые могут нивелироваться лечением агонистом GPR119.

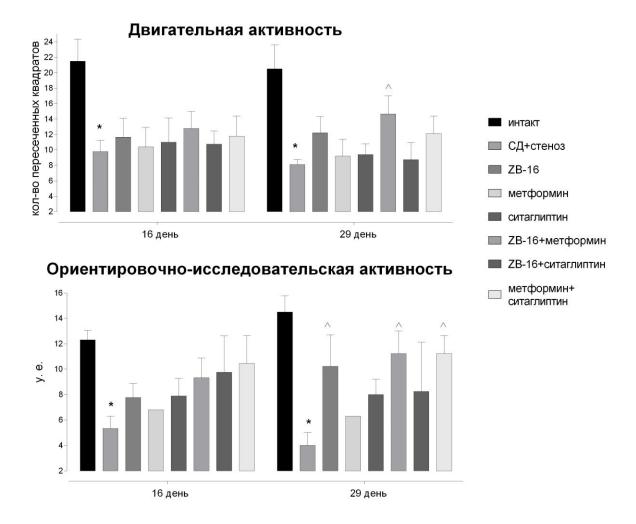


рис. 14. Результаты тестирования в Открытом поле крыс с ХНМК и СД, получавших лечение. Примечание: у.е. — сумма показателей ориентировочно-исследовательской активности: стойки, заглядывания в норки, груминг; * - различия достоверны относительно группы интакт при p<0,05; ^ - различия достоверны относительно группы СД+стеноз при p<0,05

4.2.3. Оценка моторного дефицита в тестах Ротарод и принудительное плавание с грузом

Об успешной коррекции низкой двигательной активности животных с комбинированной патологией соединением ZB-16 и его комбинацией с метформином говорят и результаты тестов Ротарод (рис. 15А) принудительное плавание с грузом (рис. 15Б). Время удержания вращающемся стержне (суммарное за три попытки) и нахождения на поверхности воды было максимальным, причем время последовательно повышалось в течение трех дней тестирования у животных, получавших комбинацию ZB-16+метформин. Следует отметить, что если в тесте Открытое поле двигательная активность между контрольной группой и животными, получавшими ситаглиптин, была статистически недостоверна, то удержания вращающемся стержне (Ротарод) время на время принудительного плавания с грузом у них, как и у группы «ZB-16», существенно отличались от животных, не получавших лечение, причем продолжительность плавания последовательно повышалось в течение трех дней тестирования, то есть наблюдался эффект "тренировки", тогда как в контрольной группе было очевидно истощение животных.

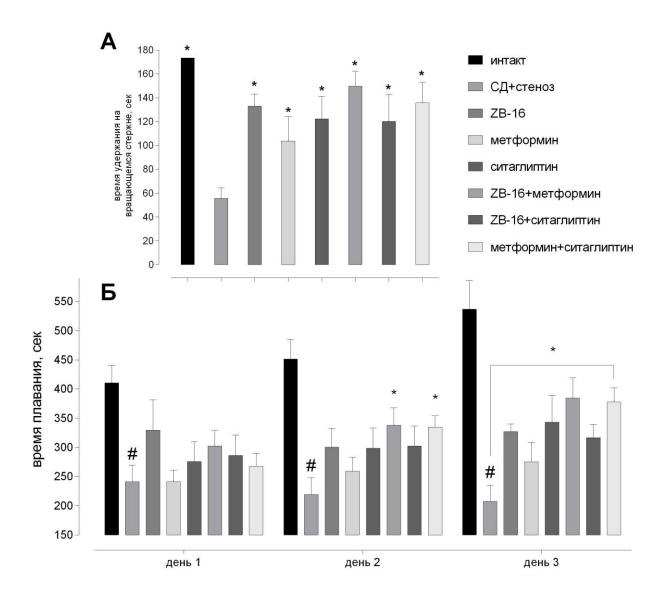


рис. 15. Результаты тестов на двигательную активность крыс с XHMК и СД, получавших лечение. А) Время удержания на вращающемся стержне в тесте Ротарод. Б) Время принудительного плавания с грузом. * - различия достоверны относительно группы СД+стеноз при p<0,05; # - различия достоверны относительно группы интакт при p<0,05

4.2.4. Оценка тактильной чувствительности и мелкой моторики в адгезивном тесте

В группах, получавших соединение ZB-16 или его комбинацию с метформином, было меньше животных, не снявших пластырь с одной или с обеих конечностей, по сравнению с контрольной группой (на 103% и 155% для группы ZB-16 и на 52% и 155% для группы ZB-16+метформин соответственно, рис. 16). Следует отметить, что количество животных, не снявших пластырь хотя бы с одной лапы к 29 дню эксперимента выросло во всех группах, за исключением крыс, получавших соединение ZB-16, у которых процент снижения составил 9% (р=0,0922). Данные показатели могут свидетельствовать о тенденции к коррекции прогрессирующих нарушений тактильной чувствительности и мелкой моторики соединением ZB-16 и его комбинацией с метформином. Следует отметить, что у крыс, получавших метформин в комбинации с ситаглиптином, доля животных. не снявших пластырь как с одной, так и с двух лап, при обоих воспроизведениях теста (на 16 и 29 дни) были минимальны (11% и 22% соответственно), хотя разница между группами была недостоверна.

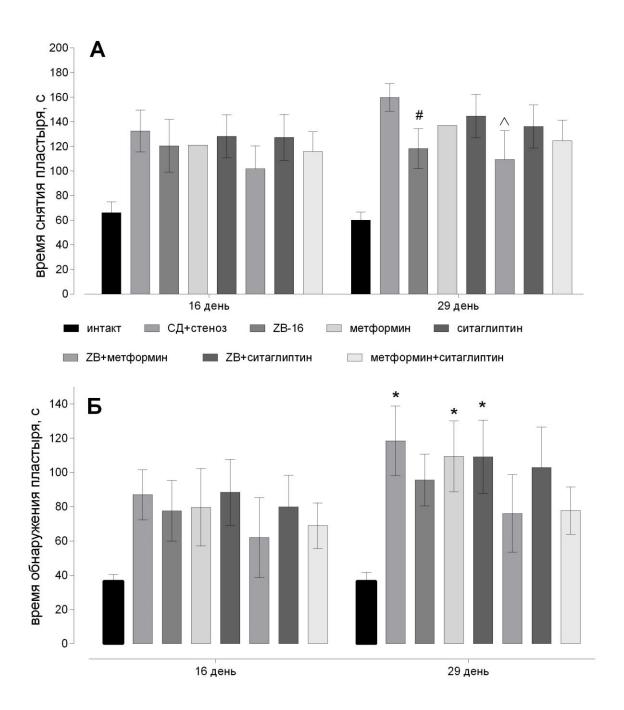


рис. 16. Результаты адгезивного теста у крыс с ХНМК и СД, получавших соединение лечение. А) Время снятия пластыря; Б) Время обнаружения пластыря. Примечание: * - различия достоверны относительно группы интакт при p < 0.05; $^{\wedge}$ - различия достоверны относительно группы $C\mathcal{L}+$ стеноз при p < 0.05; # - p = 0.1663 относительно группы $C\mathcal{L}+$ стеноз

4.2.5. Оценка поведения животных в тесте закапывания стеклянных шариков

В тесте закапывания стеклянных шариков наибольшее отличие от контрольной группы было зафиксировано у животных, получавших соединение ZB-16 в комбинации с ситаглиптином, и метформин с ситаглиптином (рис. 17). В данных группах наблюдалось большее количество шариков, сдвинутых с места, как на 16, так и на 29 дни, а также меньшее И нетронутых шариков. Эти результаты число закопанных свидетельствовать о снижении стереотипного и тревожного поведения крыс, получающих данные комбинации препаратов: они не испытывали тревогу при обнаружении незнакомых предметов (стеклянных шариков) и не прятали (не закапывали) их. Вместе с этим, большое число шариков, сдвинутых с места, говорит о сохранный двигательной активности животных, получавших ситаглиптин в комбинации с соединением ZB-16 и метформином: они находили шарики, исследовали их (сдвигали с места), однако не закапывали.

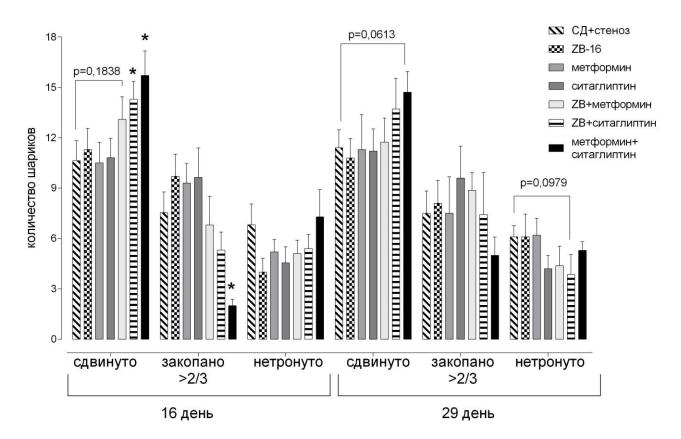


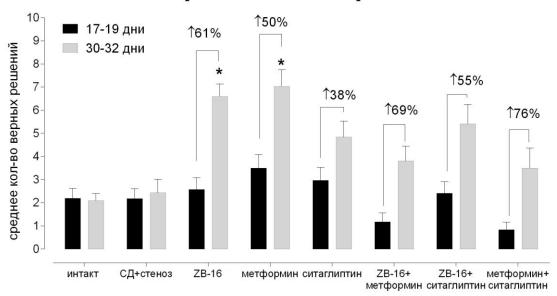
рис. 17. Результаты теста "закапывания стеклянных шариков" у крыс с XHMК и СД, получавших лечение. Примечание: * - различия достоверны относительно группы СД+стеноз при p<0,05

4.2.6. Оценка обучаемости и рабочей памяти в Т-и Y-образных лабиринтах

При тестировании в Т-образном лабиринте животные, получавшие соединение ZB-16 и метформин, делали правильный выбор чаще других групп на протяжении всех 6-ти дней тестирования (рис. 18), процент отличия от контрольной группы составил 50% и 56% соответственно. Количество животных, нашедших кормушку, в группе СД+стеноз снизилось к 30-му дню эксперимента на 25%, в то время как лечение диабета корректировало данный показатель: так, доля крыс, которые выбирали подкрепляемый рукав, была наибольшей у получавших соединение ZB-16 (на 81% по сравнению с контрольной группой), причем добавление метформина или ситаглиптина к лечению существенно не влияло на данный показатель.

Время подхода к кормушке к концу эксперимента уменьшилось во всех группах, за исключением контрольной, однако наибольшее снижение наблюдалось у животных, получавших соединение ZB-16 или метформин. Следует отметить, что этот показатель на 17-й день в группе, получавшей комбинацию ситаглиптина и соединения ZB-16, был наибольшим (231,1±22) с). Животные этой группы на 17-й день эксперимента чаще оставались в исходном рукаве, в развилке времени проводили мало, ошибок тоже совершали меньше других. Данный факт мог бы быть связан с низкой активностью, двигательной однако результаты тестов Ротарод принудительное плавание опровергают ЭТО предположение. Хорошо известно. что ингибиторы ДПП-4 снижают аппетит замедляют опорожнение желудка. Скорее всего, животные, получавшие ситаглиптин и его комбинацию с ZB-16, на 17-19 дни в T- и Y-образных лабиринтах после попадания в малознакомую среду проявляли сниженную активность в связи с низким чувство голода. При помещении в лабиринты на 30-32 дни окружение для них было уже знакомо, крысы "вспоминали" свою задачу, и время подхода к кормушке к концу эксперимента в группе ZB+ситаглиптин снизилось на 79% и стало минимальным.

Т-образный лабиринт



Ү-образный лабиринт

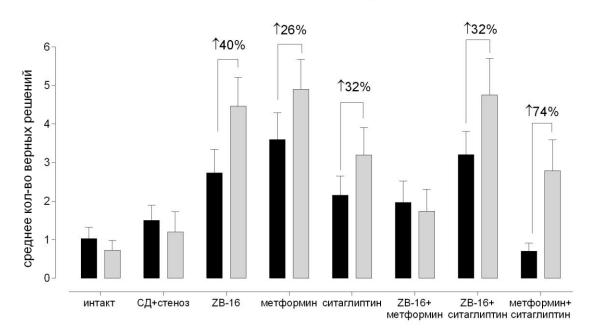


рис. 18. Количество верных решений (выбор подкрепляемого рукава) в Т- и Y-образных лабиринтах. Примечание: * - различия достоверны относительно группы $C\mathcal{I}+$ стеноз при p<0,05

Количество ошибок как на 17-й, так и на 30-й дни тестирования в Тобразном лабиринте было наименьшим в группах, получавших ситаглиптин и его комбинацию с соединением ZB-16, причем при первой серии

тестирования (17-19)дни) отличие ОТ контрольной группы было статистически достоверно и составило 45% и 44% соответственно (рис. 19А). Животные, получавшие лечение, значительно реже оставались в развилке по окончании 2 минутного периода (рис. 19Б) и возвращались в исходный рукав из развилки, тогда как данные показатели контрольной группы выросли к концу эксперимента (на 42% и 86% соответственно). Время пребывания в развилке при обеих сериях тестирования во всех группах, получавших лечение, было существенно меньше контрольной (p<0,05) и незначительно отличалось между группами.

В целом, животные, получавшие лечение, в Т-образном лабиринте делали правильный выбор чаще и быстрее контрольной группы, и наилучшие результаты наблюдались в группах, получавших соединение ZB-16 и метформин (рис. 18). Следует отметить что у животных, получавших комбинацию метформина и ситаглиптина, к концу эксперимента хотя и наблюдалась тенденция к увеличению количества верных решений (р=0,299), однако остальные показатели не отличались от контрольной группы.

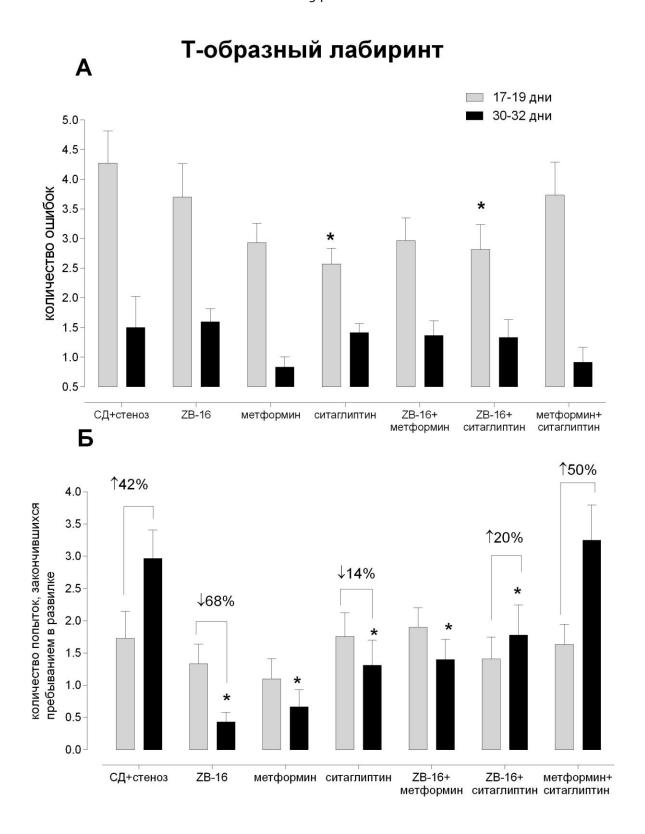
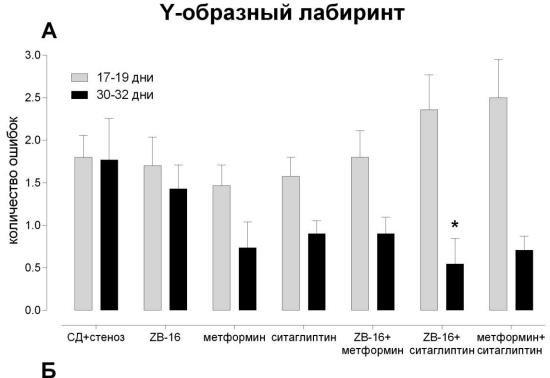


рис. 19. Количество ошибок (A) и количество попыток, закончившихся пребыванием в развилке (Б) при тестировании крыс, получавших лечение, в Т-образном лабиринте. Примечание: * - различия достоверны относительно группы СД+стеноз при p < 0.05

При тестировании в Y-образном лабиринте показатели в целом мало отличалась от таковых в Т-образном лабиринте. Все животные на 17-й день эксперимента (при первой серии тестирования) в Т-лабиринте делали больше ошибок, по сравнению с Y-образным лабиринтом (на 62%), тогда как на 30 день эксперимента среднее количество ошибок между лабиринтами мало отличалось (1,36 и 1,29 в Y-и Т-лабиринтах соответственно). Данный факт возможно объясняется тем, что Т-лабиринт представляет собой темный, закрытый коридор, с непрозрачными стенками и с резким поворотом в развилке, тогда как в Y-лабиринте животные могли видеть приманку через прозрачные перегородки. Среднее количество верных решений в течение 6-ти дней тестирования (рис. 18) было наибольшим в группах, получавших соединение ZB-16 и метформин, аналогично Т-лабиринту, и отличалось от контрольной группы на 62,9% и 68,2% соответственно.

Количество ошибок (рис. 20А) как на 17, так и на 30 дни эксперимента, у крыс группы «СД+стеноз» было максимально, тогда как животные, получавшие лечение, к концу эксперимента реже выбирали неправильный рукав (так, число ошибок группы ZВ-16+метформин к 30 дню снизилось на 50% по сравнению с 15-м). Среднее количество верных решений и доля животных, нашедших приманку, были максимальны в группах, получавших соединение ZВ-16 и метформин. Эти животные реже других оставались в исходном рукаве и в развилке по окончании 2-х минут (рис. 20Б), а также меньше времени проводили в развилке (на 27% по сравнению с контрольной группой). Время подхода к кормушке в Y-лабиринте у этих групп снизилось к 30 дню на 48,9% и 35,4% соответственно. Количество ошибок как на 17-й, так и на 30-й дни тестирования было наименьшим в группах, получавших метформин и его комбинацию с соединением ZВ-16, причем при первой серии тестирования (17-19 дни) отличие от контрольной группы было статистически достоверно и составило 45% и 44% соответственно.



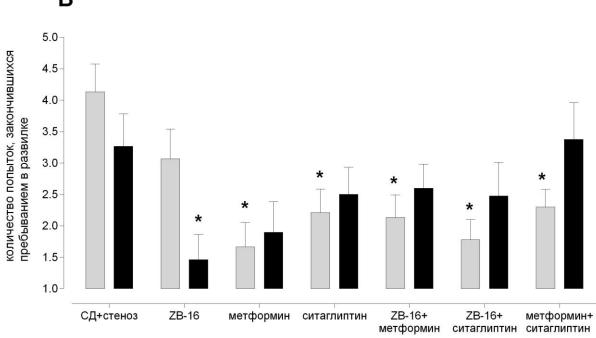


рис. 20. Количество ошибок (A) и количество попыток, закончившихся пребыванием в развилке (Б) при тестировании крыс, получавших лечение, в Y-образном лабиринте. Примечание: * - различия достоверны относительно группы $C\mathcal{L}+$ стеноз при p<0.05

В целом, животные, получавшие соединение ZB-16 и препарат сравнения метформин, в обоих лабиринтах делали правильный выбор чаще контрольной группы на протяжении всех 6-ти дней тестирования, они значительно реже проявляли апатию и пассивность, оставаясь в исходном рукаве, меньше времени проводили в развилке и совершали меньше ошибок.

4.2.7. Оценка обучаемости и кратковременной пространственной памяти в лабиринте Барнс

В лабиринте Барнс, после помещения животных в центр арены, у них наблюдалось типовое поведение – поиск норки, что сопровождалось побежками от одной «ложнонорки» к другой. Время нахождения норки и количество ошибок на протяжении 5-ти дней тестирования мало отличалось между группами, однако больше половины животных, не получавших лечение (контрольная группа), в первый день тестирования не смогли найти норку в течение 5 минут (рис. 21). На протяжении 5 дней тестирования в лабиринте Барнс полностью обучились только интактные крысы и животные, получавшие соединение ZB-16 в мототерапии и В комбинации с ситаглиптином (100% группы), тогда как среди животных, получавших только метформин или ситаглиптин – по 90%. Доля животных, нашедших норку, в группе ZB+ситаглиптин, в 1 день тестирования была наибольшей, а на 4-й день - существенно меньше, чем у контрольной группы, что можно объяснить развитием габитуации к условиям тестирования. получавшие данную комбинацию, быстрее других запомнили установку теста, она перестала быть для них аверсивной, и животные, заглядывая в норку, не заходили в нее, а продолжали перемещаться по арене.

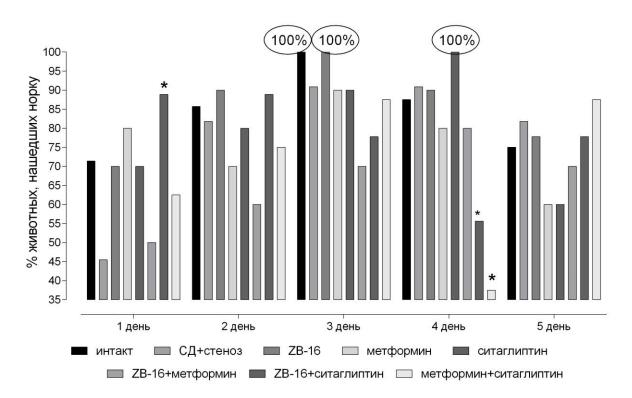


рис. 21. Доля животных (%) с XHMК и СД, получавших лечение, которые смогли найти норку в лабиринте Барнс в течение 5 минут. Примечание:

* - различия достоверны относительно группы СД+стеноз при p<0,05

Заключение

Инкретиномиметики, помимо основного метаболического эффекта (гипогликемическое глюкозозависимое действие), обладают рядом плейотропных эффектов, в том числе нейропротекторным, что связано с широким распространением рецепторов к ГПП-1 в различных структурах головного мозга: гипоталамусе, гиппокампе, стриатуме, стволе мозга, черной субстанции и субвентрикулярной зоне [de Graaf C., 2016].

В нашем исследовании новый агонист GPR119 - соединение ZB-16 как в монотерапии, так и в комбинации с метформином или ситаглиптином существенно повышало ориентировочно-исследовательскую и двигательную активность животных, при тестировании в лабиринтах они были более активны, реже оставались в развилке и в исходном рукаве по окончании 2-х минутного периода, а также совершали меньше ошибок. Группа, получавшая

только ZB-16, делала больше правильных решений в Т- и Y-лабиринтах на протяжении всех 6-ти дней тестирования, в лабиринте Барнс лишь эти животные все (100%) смогли найти норку на 3-й день. Введение метформина и ситаглиптина в меньшей степени, чем соединение ZB-16, улучшало когнитивные функции животным с XHMK на фоне СД. Таким образом, новый агонист GPR119 может эффективно корректировать когнитивные нарушения при сочетанной патологии.

Таблица 4. Результаты тестирования животных, получавших гипогликемическую терапию на протяжении 40 дней.

Проводимые	ZB-16	MET	СИТ	ZB+MET	ZB +СИТ	МЕТ+СИТ
тесты/группы						
животных						
УРПИ				V	V	
NET	V		$\sqrt{}$	V	V	V
Открытое	N			J		V
поле	V			V		٧
адгезивный				$\sqrt{}$		
Закапывание	V				V	V
шариков	V				V	V
Ротарод и	V	V	V	$\sqrt{}$	$\sqrt{}$	V
плавание	•	,	•	•	•	,
Т-и Ү-	1	1	1		V	
лабиринты	V	V	V		V	
Барнс	V	√			$\sqrt{}$	

Примечание. Указаны группы животных, получавших соответствующее лечение в течение 4 недель, и проводимые тесты. Знаком √ отмечены группы животных, которые в данном тесте статистически значимо отличались от контрольной группы СД+стеноз. МЕТ- группа животных, получавшая метформин, СИТ- группа животных, получавшая ситаглиптин, МЕТ+СИТ - группа животных, получавшая комбинацию метформина и ситаглиптина.

ГЛАВА 5. МЕХАНИЗМ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ СОЕДИНЕНИЯ ZB-16 ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ НАРУШЕНИИ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Нарушение гемодинамических процессов вследствие атеросклероза и сахарного диабета ухудшает мозговое кровообращение, а увеличение процента стеноза достоверно ухудшает когнитивные способности пациентов [Хасанова Д. Р., 2015]. Вместе с этим, доказана связь гипергликемии и нарушения познавательных функций. И сахарный диабет, и ХНМК как самостоятельные этиологические факторы независимо от друга снижают когнитивные функции. Однако степень и вклад каждого из этих факторов не в полной мере ясен.

Поэтому на данном этапе оценивалось влияние соединения ZB-16 и его комбинаций на мозговой кровоток и кровоток в общих сонных артериях животных с комбинированной патологией СД и ХНМК, а также на относительную плотность нейронов и сосудов микроциркуляторного русла в гиппокампе, моторной и соматосенсорной коре ГМ.

5.1. Оценка влияния соединения ZB-16 на кровоток в общих сонных артериях и в проекции средней мозговой артерии у животных с хроническим нарушением мозгового кровообращения и экспериментальным сахарным диабетом

К концу эксперимента при оценке уровня кровотока по ОСА во всех группах, за исключением интакта, наблюдалось снижение по сравнению с данными после операции: на 22% в группе стеноза, на 33% в группе комбинированной патологии. У животных с СД без окклюзии ОСА кровоток по ОСА был снижен на 10% относительно исходного уровня (рис. 22).

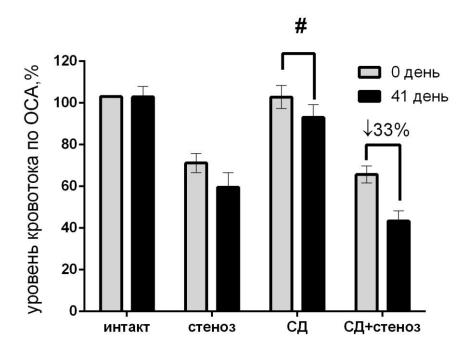


рис. 22. Уровень кровотока по ОСА (средний между левой и правой) на 0 день (перед операцией стенозирования) и в конце эксперимента (41 день). * - p=0.1517 относительно группы Стеноз, # - p=0.2259 относительно группы Интакт

группах, получающих противодиабетическое лечение, тоже наблюдалось снижение кровотока в ОСА по сравнению с исходным уровнем (в 0-й день после операции), хотя и не такое значительное, как в контрольной группе (рис. 23). Наибольшую разницу с группой СД+стеноз следует отметить у животных, получавших соединение ZB-16 и его комбинацию с ситаглиптином (кровоток в ОСА был больше контрольной группы на 42% и 45% соответственно). Процент снижения кровотока по ОСА через 40 дней у животных, получавших соединение ZB-16, а также метформин в комбинации с ситаглиптином был минимален: -15% и -12% соответственно, однако не статистически значимо. Следует отметить, что у животных, получавших метформин, к 40 дню кровоток в ОСА снизился на 25% (р<0,05 по сравнению с 0-м днем).

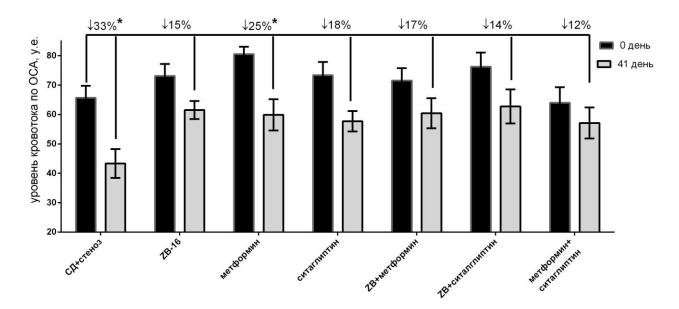


рис. 23. Уровень кровотока по ОСА (средний между левой и правой) на 0 день (перед операцией стенозирования) и в конце эксперимента (41 день). * - различия достоверны относительно 0 дня при p < 0.05

В проекции средней мозговой артерии уровень мозгового кровотока у животных с комбинированной патологией СД+стеноз был наименьшим из всех групп (рис. 24) и на 34% ниже группы Стеноз (p<0,05).

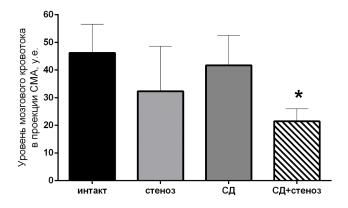


рис. 24. Уровень мозгового кровотока в проекции СМА, у.е. * - различия достоверны относительно группы Стеноз при p < 0.05

У всех животных, получавших лечение, кровоток в проекции СМА был выше контрольной группы (рис. 25), но статистически значимая разница наблюдалась только у крыс, получавших соединение ZB-16 (разница с группой СД+Стеноз составила 38%, p<0,05).

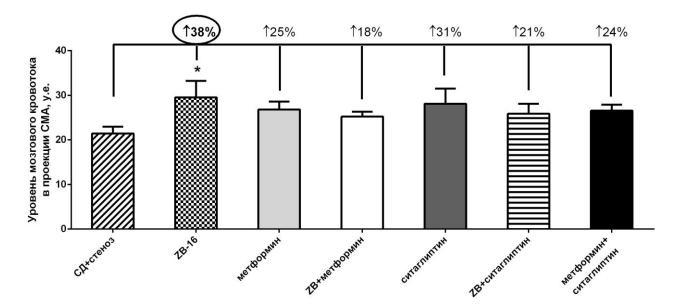


рис. 25. Уровень мозгового кровотока в проекции СМА, у.е. * - различия достоверны относительно группы СД+Стеноз при p<0.05

5.2. Оценка влияния соединения ZB-16 на вазодилатирующую функцию эндотелия животных с хроническим нарушением мозгового кровообращения и экспериментальным сахарным диабетом

Оценка вазодилатирующей функции эндотелия проводилась посредством измерения скорости мозгового кровотока в проекции СМА после внутривенного введения модификаторов синтеза эндогенного оксида азота - ацетилхолина (0,01 мг/кг), и последующем, после восстановлении мозгового кровотока до исходного уровня, нитро-L-аргинина в дозе 10 мг/кг [Тюренков И. Н., 2008]. По проценту прироста/снижения СМК относительно исходного уровня судили о мощности NO-синтазной системы эндотелия.

В группе комбинированной патологии введение ацетилхолина вызывало минимальное увеличение скорости церебрального кровотока (+15%), а введение нитро-L-аргинина – минимальное снижение (-18%), что было значительно меньше интактной группы (на 59% и 58% соответственно, р<0,05, рис. 26). Следует отметить, что у животных с СД без стеноза ОСА изменение уровня кровотока после введения модификаторов синтеза NO

было существенно меньше интактных животных: на 46% и 50% после введения ацетилхолина и нитро-L-аргинина соответственно, оба p<0,05. Данный факт может свидетельствовать о прогрессирующем нарушении функционального состояния эндотелия у животных с сахарным диабетом, что очевидно связано с базальной и стимулирующей продукцией оксида азота.

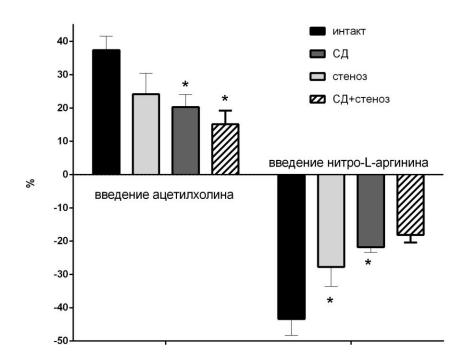


рис. 26. Оценка функционального состояния эндотелия у животных с СД и ХНМК, не получавших лечение. * - p<0,05 относительно группы интакт

При оценке влияния соединения ZB-16 на вазодилатирующую функцию эндотелия было отмечено, что у крыс, получавших соединение ZB-16 или его комбинацию с метформином, скорость кровотока в проекции среднемозговой артерии повышалась при введении ацетилхолина на 51% и 101% по сравнению с контрольной группой, и снижалась при введении нитро-L-аргинина на 39% и 106% по сравнению с контролем для групп «ZB-16» и «ZB-16+метформин», соответственно.

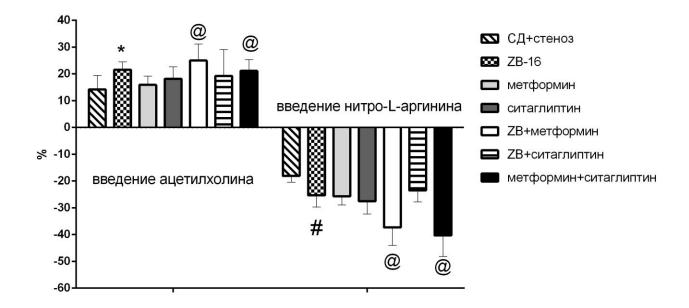


рис. 27. Оценка эндотелийзависимой вазодилятации у животных с СД и XHMK, получавших противодиабетическую терапию в течение 40 дней. *-p=0,1177 относительно группы СД+стеноз, #-p=0,1620 относительно группы СД+стеноз

Резюмируя вышесказанное, можно заключить, что соединение ZB-16 в комбинации с метформином, а также метформин с ингибитором ДПП-4 ситаглиптином могут восстанавливать нарушенное функциональное состояние эндотелия у животных с хроническим нарушением мозгового кровообращения и экспериментальным сахарным диабетом.

5.3. Оценка влияния соединения ZB-16 на плотность нейронов и сосудов микроциркуляторного русла головного мозга крыс с хроническим нарушением мозгового кровообращения и экспериментальным сахарным диабетом

При анализе относительной плотности нейронов и сосудов микроциркуляторного русла в различных регионах гиппокампа в зоне CA1 у всех животных, получавших лечение, плотность нейронов была статистически значимо выше контрольной группы СД+стеноз (p<0,05), причем наибольшая разница была зафиксирована в группах, получавших соединение ZB-16: на 41,3% больше в группе ZB-16, на 63,9% в группе ZB+метформин и на 42,6% в группе ZB+ситаглиптин (Таблица 5).

В зоне CA3+CA4 в целом картина была аналогична, причем наибольшая разница с контрольной группой наблюдалась у животных, получавших комбинированную терапию ZB+ситаглиптин — на 85,4%. Следует отметить, что у крыс, получавших метформин и метформин в сочетании с ситаглиптином, статистически значимой разницы с контролем не было, тогда как в группе ZB+метформин она появилась, хотя и была минимальна — 37,4% (р<0,05). По плотности сосудов МЦР существенных различий между группами не наблюдалось.

Таблица 5Относительная плотность нейронов и сосудов микроциркуляторного русла в различных регионах гиппокампа и функциональных отделах коры головного мозга

Структуры гиппокампа	Относительная плотность	интакт	СД	Стеноз	СД+Стеноз	ZB-16	ZB+Мет	ZB+Сит	Сит	Мет	Сит+Мет
Зона СА1 гиппо-	Сосуды МЦР	1,47±0,18	1,25±0,24	1,21±0,18	1,06±0,13	1,22±0,16	1,09±0,22	1,09±0,14	0,96±0,18	1,21±0,11	1,07±0,15
кампа	Нейроны	18,10±0,81	13,83±0,29	12,08±0,57	9,64±0,45	13,62±0,40*	15,80±1,01*	13,75±0,65*	12,28±0,54*	10,03±0,72	12,93±0,71*
Зоны САЗ+СА4	Сосуды МЦР	1,52±0,54	1,06±0,11	0,84±0,10	0,96±0,16	1,04±0,19	1,31±0,19	0,94±0,13	0,74±0,11	1,22±0,31	1,29±0,15
гиппокампа	Нейроны	21,63±1,39	16,55±1,01	14,53±0,62	9,49±0,51	13,79±0,81*	13,04±0,61*	17,59±1,39*	15,34±0,84*	7,79±0,46	9,93±0,61
Моторный отдел	Сосуды МЦР	2,19±0,21	2,00±0,09	1,42±0,26	1,17±0,10	1,33±0,10	0,98±0,13	1,83±0,51	1,29±0,17	2,01±0,25*	1,49±0,20
коры ГМ	Нейроны	12,35±0,71	7,68±0,46	5,44±0,22	6,84±0,23	8,20±0,35*	6,58±0,18	8,38±0,39*	5,43±0,37	7,56±0,29	5,35±0,15
Соматосенсорный	Сосуды МЦР	2,54±0,20	1,92±0,24	1,32±0,11	1,04±0,08	2,15±0,14*	1,12±0,12	1,72±0,20*	1,80±0,13*	1,70±0,15*	1,78±0,23*
отдел коры ГМ	Нейроны	15,35±0,36	7,13±0,31	5,82±0,35	5,53±0,24	6,64±0,18*	7,98±0,31*	8,92±0,46	5,50±0,11	8,97±0,19*	8,19±0,26*

Примечание. *- показатели ($M\pm m\%$) статистически значимо отличаются от группы СД+Стеноз при p<0,05. Сосуды МЦР - сосуды микроциркуляторного русла, ΓM - головной мозг

При анализе относительной плотности нейронов и сосудов микроциркуляторного русла в различных функциональных отделах коры головного мозга было обнаружено, что в моторном отделе коры только у животных, получавших метформин, относительная плотность сосудов МЦР отличалась от контрольной группы - на 41% (р<0,05), тогда как между другими группами значимой разницы зафиксировано не было. Наибольшая относительная плотность нейронов в моторном отделе коры головного мозга наблюдалась у крыс, получавших соединение ZB-16 и его комбинацию с ситаглиптином: на 19,9% и на 22,5% соответственно больше группы СД+стеноз (табл. 3).

В соматосенсорном отделе коры головного мозга относительная плотность сосудов МЦР была максимальна у животных, получавших соединение ZB-16 - на 106,7% больше контрольной группы (p<0,05). Наибольшая относительная плотность нейронов в соматосенсорном отделе коры была зафиксирована в группах, получавших метформин и его комбинации: на 62,2% (метформин), 44,3% (ZB+метформин) и 48,1% (метформин+ситаглиптин) больше группы СД+стеноз.

ГЛАВА 6. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нарушение когнитивных функций у больных сахарным диабетом 2 типа начинается примерно на 2 года раньше по сравнению со здоровыми людьми [Гацких И. В., 2017], а деменция развивается в 1,5–3 раза чаще, чем у людей без диабета [Groeneveld O. N., 2016]. Нарушение секреции инсулина на периферии может быть фактором инициирования или ускорения развития нейродегенеративных процессов: так, у пациентов с СД 2 типа риск развития болезни Альцгеймера повышен на 65%, в то время как у 85% пациентов с БА обнаруживается либо СД 2 типа, либо повышенный уровень глюкозы натощак [Candeias E. M., 2015]. Необходимо отметить, что согласно систематическому обзору Кокрана, в настоящее время не существует убедительных доказательств профилактики или лечения когнитивных нарушений при СД 2 типа противодиабетическими препаратами [Areosa S. A., 2017].

Средства, влияющие на систему инкретинов, применяются на практике более 10 лет. В последние годы эти препараты привлекают все большее внимание в связи с обнаруженными плейотропными свойствами ГПП-1. Установлено, что инкретиномиметики, проникая через ГЭБ путем пассивной диффузии [Groeneveld O. N., 2016], улучшают синаптическую передачу и нейрогенез, усиливают дифференцировку нейронов, снижают апоптоз, модулируют нейрональную активность, препятствуют процессам свободнорадикального окисления [Власов Т. Д., 2016]. Рецепторы ГПП-1, помимо поджелудочной железы, находятся также гипоталамусе, черной субстанции гиппокампе, стриатуме, стволе мозга, И субвентрикулярной 2010], зоне [Harkavyi A., TOM числе В нейронах, нигростриатальных потеря которых является характерной особенностью болезни Паркинсона [de Graaf C., 2016].

Инкретины обладают нейропротекторными свойствами, защищая клетки от апоптоза, вызванного оксидативноым стрессом [Kimura R., 2009]. Доказано влияние инкретинов на синаптическую пластичность, долгосрочное потенцирование и формирование памятного следа [Fedele E., 2016]. Долговременная потенциация представляет собой усиление синаптической передачи между нейронами, сохраняющееся на протяжении длительного времени [Ратушняк А.С., 2013]. Усиление долгосрочного потенцирования и синаптической пластичности приводит к улучшению пространственного обучения и памяти крыс, а также может предотвратить или замедлить нейродегенеративные процессы [Gengler S., 2012].

Предполагается, что нейропротективный эффект ГПП-1 обусловлен активацией сигнального пути РІЗК/АКТ и влиянием на метаболизм предшественника β-амилоида (amyloid precursor peptide, APP) [Kimura R., 2009; de Graaf C., 2016]. Активация рецепторов ГПП-1 приводит к увеличению внутриклеточного цАМФ, который активирует протеинкиназу A (protein kinase A, PKA) и фосфатидилинозитол-3-киназу (phosphoinositide 3-kinase, PI3K), которая фосфорилирует и активирует целый ряд нижележащих сигнальных путей. Эти пути упрощенно могут быть разделены на две ветви: сигнальный путь MAPK/ERK (mitogen-associated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase, Ras-Raf-MEK-ERK); и PI3K/протеинкиназа В (АКТ). Сигнальный путь РІЗК/АКТ является основным регулятором клеточных функций, вызывает фосфорилирование и ингибирование более 50 субстратных белков, в том числе гликоген-синтазы-киназы 3 (Glycogen synthase kinase 3 beta, GSK-3β), а также усиление синтеза белка, клеточной пролиферации, индукцию митохондриального биогенеза, и в то же время ингибирование апоптоза и процесса воспаления.

GSK-3β является основной киназой, способствующей фосфорилированию τ-белка и агрегации Аβ пептидов через модуляцию метаболизма предшественника β-амилоида. Апоптоз, опосредованный GSK-3β, приводит к активации каспазы-3 через уменьшение экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 [Yun, S. I., 2009]. Установлено, что ингибирование GSK-3β может способствовать аутофагии и остановить

экспрессию и агрегацию белка α-синуклеина и его последующие нейротоксические эффекты при болезни Паркинсона [Athauda D., 2016].

ГПП-1 также влияет на транскрипционный ядерный фактор NF-кВ, одну из мишеней сигнального пути РІЗК/АКТ, который опосредует активацию клеток микроглии и провоспалительных цитокинов, а также связан с патогенезом болезни Паркинсона [Athauda D., 2016]. Усиление активности пути АКТ вследствие активации рецепторов ГПП-1 приводит в том числе к угнетению фактора транскрипции FOXO1 (forkhead box protein O1) и снижению продукции проапоптотических белков (BiM and FAS), в то время как одновременное повышение цАМФ при активации рецепторов ГПП-1 способствует усилению экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2 Bcl-XL. В совокупности эти процессы способствуют сохранению митохондриальной функции, стабилизируя наружную мембрану митохондрий, предотвращая выход цитохрома С в цитоплазму и уменьшая активацию каспаз 9 и 3, что впоследствии приводит к торможению апоптоза и окислительного стресса [Zhan Y., 2012; Li Z., 2013; Athauda D., 2016].

Еще одним важным звеном сигнального пути PI3K/АКТ является транскрипционный фактор CREB, который регулирует экспрессию ряда генов, улучшающих синаптическую пластичность, и в том числе нейротрофический фактор мозга (BDNF) [Wenda X., 2016]. BDNF стимулирует и поддерживает развитие нейронов, увеличивает численность и усиливает дифференциацию новых нейронов и синапсов, влияет на долговременную память [Ohtake N., 2014].

Таким образом, стимуляция клеточной пролиферации, трофическое действие и антиапоптотический эффект ГПП-1 по крайней мере, частично опосредуются сигнальным путем PI3K/AKT. В то же время дискоординация этого пути связана развитием таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера [Kitagishi Y., 2014] и болезнь Паркинсона [Jha S. K., 2015].

Агонисты GPR119, повышающие уровни инкретинов, являются

перспективной группой гипогликемических средств с плейотропными эффектами, в том числе нейропротекторным.

В данном исследовании оценивалась возможность применения агониста GPR119, соединения ZB-16, при когнитивных нарушениях, связанных с хроническим нарушением мозгового кровообращения и ЭСД.

В литературе описано несколько исследований подобной комбинированной патологии. Так, у крыс диабетической линии BBZDR/Wor через 4 недели после операции стенозирования правой ОСА (введение балонного катетера) наблюдалось значительно большее снижение просвета сосуда и увеличение образования неоинтимы по сравнению с животными той же линии, но не подвергшимися операции [Tirabassi R. S., 2004]. В другом исследовании у крыс со СТЗ-индуцированным СД на фоне приема высококалорийной пищи (high-fat diet, HFD) вызывали стеноз левой наружной сонной артерии путем введения балонного катетера. Через 3 недели после операции сужение сосуда в значительной степени усугублялось диабетом: были обнаружены повышенная пролиферации ГМК, увеличение производства активных форм кислорода, повышение экспрессии белка PCNA и циклина D1, усиливающих пролиферацию сосудистой стенки [Wang, K. 2014]. Однако в отечественной литературе нам не удалось найти исследований поведения животных с комбинированной патологией – ЭСД и XHMK.

В данном исследовании мы использовали модель ХНМК путем стенозирования общих сонных артерий (на 50% от начального уровня), никотинамид-стрептозотоциновую модель ЭСД и сочетанную патологию ЭСД и ХНМК. Для оценки степени функциональных психоневрологических и когнитивных нарушений нами был использован комплексный подход. Комбинированная патология более выражено, чем СД, снижала когнитивные функции, но еще более выраженные нарушения фиксировались у животных, которым воспроизводились и ХНМК, и СД. У крыс с комбинированной патологией хуже формировался и быстрее угасал условный рефлекс

пассивного избегания, они хуже обучались навыку решения экстраполяционной задачи в ТЭИ. В лабиринте Барнс было выявлено нарушение пространственной, рабочей и долговременной памяти: среднее время нахождения норки и количество ошибок на протяжении всего периода тестирования было максимально в группе животных с комбинированной патологией.

При тестировании в Т- и Ү-образных лабиринтах крысы с ХНМК и СД совершали правильный выбор реже других групп и чаще отказывались от принятия решения, оставаясь в развилке или возвращаясь в стартовый рукав, что может говорить о растущей апатии и заторможенности. Кроме того, такое животных комбинированной патологией поведение c может свидетельствовать о низкой двигательной активности, что проявлялось и в других тестах. Так, в Открытом поле они пересекали меньше секторов, реже заглядывали в отверстия, имитирующие норки, и совершали меньше стоек, чем другие группы; при этом показатели, фиксируемые через 29 дней, были ниже, отмеченных через 16. Данный факт может свидетельствовать об угасании реакции на новизну, растущей апатии животных с комбинированной патологией, а также об их низкой двигательной активности или мышечной слабости.

Эти результаты коррелируют с тестами на локомоторную активность, в которых крысы с ХНМК и СД меньше времени держались на вращающемся стержне установки «Ротарод» и быстрее уставали при плавании с грузом, причем время плавания последовательно снижалось на протяжении трех дней тестирования. Животные с комбинированной патологией в тесте закапывания стеклянных шариков большее количество времени проводили без движения, о чем свидетельствует меньшее число смещенных стеклянных шариков. В то же время у интактных крыс больше шариков было закопано или сдвинуто с места, при этом здоровые животные сдвигали больше, а закапывали меньше.

О прогрессирующем нарушении чувствительности и мелкой моторики, а также о дисфункции нервной системы животных с ХНМК и СД свидетельствуют и результаты адгезивного теста, в котором латентный период обнаружения и время, затраченное на избавление от пластыря в группе СД+стеноз было максимальным среди всех животных.

Полученные результаты о более выраженных нарушениях когнитивной функции у животных с комбинированной патологией хорошо согласуются с данным клинических наблюдений. Так снижение интеллекта у больных СД 2 чаще бывает легким или умеренным [Левин О. С., 2015], но не тяжелым, в то время как тяжесть когнитивных нарушений определяется степенью стеноза артерий и НМК [Хасанова Д. Р., 2015]. В клинических условиях сахарный диабет и хроническое нарушение мозгового кровообращения часто формируются и развиваются параллельно, значительно нарушая когнитивные функции пациентов [Гацких И. В., 2015].

Очевидно, что выявленное нарушение в обучаемости и памяти крыс с ХНМК и СД связано с выраженными дегенеративными изменениями в головном мозге: снижением относительной плотности нейронов и сосудов МЦР в гипокампе и соматосенсорном отделе коры, вследствие более низкого уровня мозгового кровотока. Выраженное нарушение мозговой гемо перфузии у животных с комбинированной патологий в данном исследовании было связано не только со стенозом ОСА, но и с возникающей на фоне гипергликемии эндотелиальной дисфункцией, что проявлялось нарушением вазодилатирующей функции эндотелия, снижением вазодилятации в ответ на введение ацетилхолина (стимулятора продукции NO) и нитро-L-аргинина (ингибитора NOS), что косвенно позволяет судить о базальной продукции оксида азота [Тюренков И. Н., 2008].

Соединение ZB-16 как в монотерапии, так и в комбинации с метформином или ситаглиптином, существенно повышало как двигательную, так и ориентировочно-исследовательскую активность животных с сочетанной патологией СД+стеноз. В тесте ТЭИ эти животные быстрее избавлялись от аверсивной среды, а в тесте УРПИ реже и позже (с большим латентным периодом) заходили в темный отсек, тогда как результаты группы

"метформин" не отличались от контроля.

Способность к обучению пищедобывательному навыку в Т-образном лабиринте у всех крыс, получавших противодиабетические препараты, мало отличалась друг от друга, но существенно — от животных без лечения. Так, количество верных решений к 30 дню увеличилось во всех лечебных группах (хотя разница между ними была незначительна). И хотя число ошибок, т.е. выбор "пустого" рукава, уменьшилось к концу эксперимента у всех животных, включая контрольную группу, у крыс, не получавших никакого лечения существенно выросло число попыток, закончившихся пребыванием в развилке (отказ от решения) и в исходном рукаве — на 41% и 86% соответственно.

Однако время подхода к кормушке у животных, получавших комбинации ZB-16+метформин и ZB+ситаглиптин как на 15, так и на 29 дни значимо не отличалось от контрольной группы (в отличие от монотерапии обоими препаратами). Количество верных решений в Т-лабиринте у этих группы к 30 дню выросло по сравнению с контролем на 69% и 55 % соответственно. У животных, получавших соединение ZB-16 в комбинации с метформином или ситаглиптином, было зафиксировано самое большое количество попыток, закончившихся пребыванием в исходном рукаве как на 17, так и на 30 дни эксперимента, причем на 29 день они оставались в исходном рукаве почти столько же раз, как и красы без лечения. На наш взгляд, такое поведение животных можно объяснить тем, что агонисты GPR119 снижают аппетит и подавляют чувство голода [Тюренков, 2018]. В нашем предыдущем исследовании использование соединения ZB-16 у животных с ожирением, обусловленным высокожировой и углеводной диетой, препятствовало повышению массы тела [Тюренков И. Н., 2016б].

Предполагается, что подавление аппетита ГПП-1 обусловлено следующим факторами. ГПП-1 действует синергетически на центральные и периферические рецепторы, расположенные в головном мозге и желудочно-кишечном тракте, что и определяет его влияние на чувство насыщения и

аппетит. Кроме того, активация рецепторов $\Gamma\Pi\Pi$ -1 дополнительно модулируется холинергическими сигналами, передающимися OT блуждающего нерва. Афферентные волокна блуждающего нерва передают информацию от хеморецепторов и механорецепторов желудочно-кишечного тракта к ядру одиночного пути, в котором ГПП-1 действует также и на локальные рецепторы, создавая таким образом локальную петлю обратной связи. Рецепторы ГПП-1 расположены в паравентрикулярном, дугообразном и вентромедиальном ядрах гипоталамуса. Обратная связь между ядром одиночного пути и паравентрикулярном ядром гипоталамуса позволяет интегрировать анорексигенные сигналы и может изменяться с помощью ГПП-1. Помимо этого, рецепторы ГПП-1 расположены на орексигенных и анорексигенных нейронах, и связывание ГПП-1 с этими рецепторыми тоже способствует формированию чувства насыщения.

Периферическое действие ГПП-1 на желудочно-кишечный тракт обусловлено, во-первых, его влиянием на дорсальное ядро блуждающего нерва и модуляцией парасимпатической иннервации толстого кишечника, что вызывает усиление его перистальтики и ускорение транзита кишечного содержимого [Dailey M. J., 2013].

Вместе с этим, в отличие от стимулирующего влияния на толстый кишечник, ГПП ингибирует перистальтику желудка и тонкого кишечника путем прямого взаимодействия и активации собственных рецепторов, расположенных на энтеральных нейронах. Задержка опорожнения желудка происходит в результате расслабления проксимального отдела желудка и сопровождается повышенным тонусом антропилорической области [Shah M., 2014]. В кишечнике $\Gamma\Pi\Pi$ -1, парасимпатическую тонком модулируя холинергическую иннервацию, снижает активность круговой мышцы кишечника [Dailey M. J., 2013].

Резюмируя вышесказанное, через эти и другие механизмы, которые пока не до конца ясны, ГПП-1 усиливает чувство насыщения и вызывает снижение аппетита. Ингибиторы ДПП-4, к которым относится референтный

препарат ситаглиптин, продлевают период полураспада циркулирующего ГПП-1, соответственно, тоже могут снижать чувство голода и аппетит. Крысы, получавшие комбинированную терапию ZB-16+метформин испытывали меньшее чувство голода, как по сравнению с животными без лечения, так и с теми, которые получали монотерапию препаратами - они реже покидали исходный рукав, очевидно, в связи с недостаточным чувством голода и как следствие низкой мотивированности поиска приманки. Однако, в отличие от животных контрольной группы, которые оставались в исходном рукаве из-за пассивности и низкой двигательной активности, что проявлялось и в других тестах (Ротарод, принудительное плавание, Открытое поле), крысы, получавшие соединение ZB-16 в комбинации с метформином, понимали свою задачу: они "знали", что в левом рукаве находится приманка, а правый рукав пустой, и их способность к обучению в Т-образном лабиринте, проявляющаяся количеством верных решений, существенно превышала контрольную группу (на 56%, p<0,05).

При тестировании в лабиринте Барнс только крысы, получавшие соединение ZB-16 все (100%) смогли найти норку на 3-й день. И хотя применение метформина и ситаглиптина тоже улучшало когнитивные функции животных с комбинированной патологией, но в меньшей степени, чем агонист GPR119.

Как видно из таблицы 2, противодиабетическое лечение как таковое нивелировало сниженную двигательную активность животных с комбинированной патологией и ускоряло решение задачи экстраполяционного избавления у всех групп, в связи с чем можно предположить, что низкая моторная активность крыс контрольной группы с ХНМК и ЭСД связана с повышенным уровнем глюкозы крови, что соотносится с данными литературы [Kou Z.-Z., 2014]. Кроме того, основными клиническими симптомами роста уровня глюкозы крови у людей тоже являются вялость и слабость [Витебская А.В., 2015].

Вместе с этим, минимальный уровень подъема глюкозы крови в ходе

проведения ПТТГ наблюдался в группе, получавшей ZB-16 в комбинации с метформином. Сопоставляя эти данные, можно допустить, что уровень гликемии не оказывает прямого влияния на обучаемость и память, тестируемые в лабиринтах. Возможно, способность к обучению и пространственная память, необходимые животным для выполнения задачи в лабиринтах, определяются не столько наличием или отсутствием гипергликемии, а другими факторами: уровнем мозгового кровотока, морфологическими изменениями в головном мозге. Как уже указывалось выше в главе 1, у пациентов с СД 2 типа строгий контроль уровня глюкозы крови также не улучшает интеллектуальные функции [Сці X., 2014].

При анализе уровня кровотока в общих сонных артериях было обнаружено, что у животных, получавших метформин в течение 4 недель, он снизился на 25% от исходного уровня, что является максимальным значением среди всех групп, получавших лечение. Данный факт коррелирует с результатами поведенческих тестов, в которых крысы, получавшие метформин, реже других выполняли свою задачу, а в некоторых тестах полученные результаты даже не отличались от контрольной группы ХНМК+ЭСД (УРПИ, ТЭИ, Открытое поле, адгезивный тест, закапывание стеленных шариков).

Церебральный кровоток в проекции СМА только у животных, получавших соединение ZB-16, был выше контрольной группы (на 38%) — это также коррелирует с результатами поведенческих тестов и может свидетельствовать о том, что память и способность к обучению как познавательные процессы зависят и определяются уровнем мозгового кровотока.

Вместе с этим, при оценке вазодилатирующей функции эндотелия статистически значимое изменение скорости мозгового кровотока после введения модификаторов синтеза оксида азота было зафиксировано в группах, получавших комбинации соединения ZB-16 с метформином и метформин с ситаглиптином, в то время как у крыс, которым вводили только ZB-16, наблюдалось незначительное увеличение эндотелийзависимой вазодилятации мозговых сосудов. Сопоставляя эти данные с результатами, полученными при

исследовании поведения животных в серии тестов, можно предположить, что нейропротективное действие соединения ZB-16 определяется в том числе и его эндотелиопротекторными свойствами.

При оценке влияния соединения ZB-16 на плотность нейронов и сосудов микроциркуляторного русла головного мозга было установлено, что в зоне гиппокампа CA1 наибольшая относительная плотность нейронов наблюдалась в группах, получавших соединение ZB-16 и его комбинации с метформином и ситаглиптином (отличие от контрольной группы CД+стеноз составило 41,3%, 63,9% и 42,6% соответственно). Эти данные согласуются с описанными Athauda D. [2016], где отмечено улучшение когнитивных функций мышей с экспериментальной болезнью Альцгеймера при введении агониста ГПП-1 лираглутида, и, по их мнению, это связано с увеличением числа нейронов зоны CA1 гиппокампа.

Таким образом, результаты данного исследования свидетельствуют о том, что применение агониста GPR119 соединения ZB-16 у крыс с хроническим нарушением мозгового кровообращения и экспериментальным сахарным диабетом существенно улучшает когнитивные функции как в монотерапии, так и в комбинации с метформином или ситаглиптином.

ВЫВОДЫ

- 1. Соединение ZB-16 у животных с комбинированной патологией хроническое нарушение мозгового кровообращения и экспериментальный сахарный диабет при курсовом введение в течение 40 дней улучшает память и обучаемость по сравнению с контрольной группой: у этих животных в тесте УРПИ отмечался больший латентный период захода в темный отсек (на 57%) и меньший латентный период подныривания в ТЭИ (на 44% по сравнению с контролем), при тестировании в Т-лабиринте они совершали меньше ошибок (на 17% по сравнению с контролем), а также чаще (на 49%) и быстрее (на 71%) принимали верное решение выбор подкрепляемого рукава и подход к приманке.
- 2. У животных с комбинированной патологией, которым вводили агонист GPR119 соединение ZB-16 в тесте Открытое поле регистрировалась более высокая ориентировочно-исследовательская (на 181%) и двигательная активность (на 81%), время удержания на вращающемся стержне в тесте Ротарод (на 169%) и время плавания с грузом «до предела» (на 52% больше по сравнению с контролем). При проведении адгезивного теста время снятия и обнаружения пластыря были на 19% меньше, чем у животных контрольной группы. Все это свидетельствует о выраженном нейропротективном действии соединения ZB-16.
- 3. Терапевтическое введение агониста GPR119 в течение 4 недель у животных с комбинированной патологией ХНМК и ЭСД оказывает выраженное гипогликемическое действие, снижая уровень глюкозы в крови (на 24% и 27%) и площадь под кривой «уровень гликемии-время» (на 32% и 31%) по сравнению с группами животных с ЭСД и ХНМК+ЭСД (все p<0,05), что говорит об улучшении утилизации глюкозы в сравнении с группами контроль-ЭСД и ХНМК+СД.
- 4.У животных, получавших соединение ZB-16 в течение 40 дней, кровоток в общих сонных артериях и в проекции среднемозговой артерии был выше,

- чем в контрольной группе СД+стеноз на 42% и 38%. При введении ацетилхолина скорость кровотока в проекции среднемозговой артерии повышалась на 56% и снижалась при введении нитро-L-аргинина на 39% больше по сравнению с контролем, что свидетельствует о более высокой базальной и стимулированной продукции эндотелием оксида азота.
- 5. При морфометрическом анализе у крыс с комбинированной патологией XHMК и ЭСД, получавших соединение ZB-16, была отмечена меньшая выраженность дегенеративных изменений головного мозга, где относительная плотность нейронов в зоне CA1 гиппокампа, моторном и соматосенсорном отделах коры была на 41,3%, 19,9 % и 15% больше, чем у контрольной группы.
- 6. Комбинирование соединения ZB-16 с метформином приводило к усилению гипогликемического действия, снижая уровень глюкозы в крови (на 11%) и площадь под кривой «уровень гликемии-время» (на 20% по сравнению с животными, которым вводили только агонист GPR119). У группы «ZB-16+метформин» также отмечалось более выраженное нейропротективное действие (снижалось время решения экстраполяционной задачи в ТЭИ на 25% и увеличивалось время до захода в ТО установки УРПИ на 17% по сравнению с животными, которые получали только соединение ZB-16) и меньшая выраженность дегенеративных изменений головного (относительная плотность нейронов в зоне СА1 гиппокампа, моторном и соматосенсорном отделах коры была на 16%, 24,6% и 20% соответственно больше, чем в группе «ZB-16». В то же время, сочетание соединения ZB-16 и ситаглиптина не приводило к усилению гипогликемического действия и нейропротективного эффекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании агонист GPR119 - соединение ZB-16 — оказывал нейропротекторный эффект и снижал когнитивный дефицит у крыс с хроническим нарушением мозгового кровообращения и гипергликемией, что обусловлено не только его гипогликемическим действием, но и инкретинопосредованным влиянием на нейродегенеративные процессы в головном мозге животных с комбинированной патологией.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- 1. Наличие нейропротекторного действия агониста GPR119 соединения ZB-16 у крыс с хроническим нарушением мозгового кровообращения и экспериментальным сахарным диабетом свидетельствует о перспективности разработки на его основе лекарственного средства для лечения пациентов с СД и нарушенными когнитивными функциями.
- 2. Результаты данного исследования о нейропротекторных эффектах агониста GPR119 целесообразно включить в учебные и методические пособия по фармакологии гипогликемических средств.
- 3. Выводы работы позволяют рекомендовать поиск новых гипогликемических препаратов из ряда агонистов GPR119 для коррекции метаболических и когнитивных нарушений у пациентов с СД.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ - Аденозинтрифосфат

БА – болезнь Альцгеймера

ГИП - глюкозозависимый инсулинотропный пептид

ГМК – гладкомышечные клетки

ГПП-1 – глюкагон-подобный пептид-1

ГПП-1 - глюкагон-подобный пептид-1

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДПП-4 - дипептидил-пептидаза

ИЛ - интерейкин

ИФР-1 - инсулиноподобный фактор роста 1

ЛМК – локальный мозговой кровоток

ЛП - латентный период

ЛП – лекарственный препарат

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота

МСР-1 - моноцитарный хемотаксический белок-1

МЦР – микроциркуляторное русло

НАДФН - никотинамидадениндинуклеотидфосфаат

ОЕА - олеоилэтаноламид

ОСА – общая сонная артерия

ПТТГ - пероральный тест на толерантность к глюкозе

ПТТГ – пероральный тест толерантности к глюкозе

РААС - ренин-ангиотензин-альдостероновая система

СД – сахарный диабет

СМА – среднемозговая артерия

СМА - средняя мозговая артерия

ТЭИ - тест «экстраполяционного избавления»

ТЭИ – тест экстраполяционного избавления

УРПИ - условная реакция пассивного избегания

УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания

ФНО – фактор некроза опухоли

ХНМК – хроническое нарушение мозгового кровообращения

цАМФ - циклический аденозинмонофосфат

ЦОГ-2 - циклооксигеназа-2

ЭД – эндотелиальная дисфункция

ЭСД – экспериментальный сахарный диабет

AGE - конечные продуты гликирования, Advanced Glycation end products

BDNF - нейротрофический фактор мозга, brain-derived neurotrophic factor

CREB - цАМФ-зависимый транскрипционный фактор, cAMP response element-binding protein

eNOS – эндотелиальная NO-синтаза

GPR119 – Рецептор 119, сопряженный с G-белком (англ. G-protein-coupled receptor 119)

NF-кВ - транскрипционный ядерный фактор «каппа-би», nuclear factor кВ

РКА - протеин-киназа А

РКС - протеин-киназа С

РҮҮ - пептид тирозин-тирозин

TGF- β - Трансформирующий ростовой фактор β , transforming growth factor β

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аметов, А. С. Роль ингибиторов ДПП-4 в коррекции нарушений жирового обмена у пациентов с СД 2 типа и ожирением / А. С. Аметов, Д. Г. Гусенбекова // Сахарный диабет. 2015. №3. С.85-92.
- Амикишиева, А. В. Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование / А. В. Амикишиева // Вестник ВОГиС. - 2009. - №13:3. - С.529-542.
- Ануфриев, П. Л. Особенности атеросклероза церебральных артерий и патоморфологии инфарктов головного мозга при сахарном диабете 2-го типа / П. Л. Ануфриев, М. М. Танашян, Т. С. Гулевская, Р. Э. Аблякимов, Е. В. Гнедовская // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2015. №3. С.4-9.
- 4. Бакулин, Д. А. Церебропротекторное действие агониста рецептора GPR119 при экспериметальной ишемии головного мозга на фоне сахарного диабета: дис. канд мед наук. ВолГМУ, Волгоград, 2016.
- Белова, А. Н. Диабетическая периферическая нейропатия: эпидемиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение / А. Н. Белова, М. Н. Кудыкин, Г. Е. Шейко // Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. 2016. №4. С.139-151.
- Белякова, Н. А. Психологический статус и качество жизни больных сахарным диабетом 2-го типа и алиментарно-конституциональным ожирением / Н. А. Белякова, Л. В. Чичановская, И. Г. Цветкова [и др.] // Кубанский научный медицинский вестник. 2013. №5. С.39-43.
- 7. Боголепова, А.Н. Болезнь Альцгеймера и сахарный диабет / А. Н. Боголепова // Медицинский Совет. 2015. №18. С.36-40.

- Величко, П. Б. Комплексное лечение диабетического макулярного отека / П. Б. Величко // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. 2014. №4. С.1097-1101.
- 9. Витебская, А. В. Сахарный диабет у детей роль педиатра в выявлении, диспансерном наблюдении и профилактике / А. В. Витебская // Медицинский совет. 2015. №14. С.94-97.
- Власов, Т. Д. Механизмы нейропротективного действия инкретиномиметиков / Т. Д. Власов, А. В. Симаненкова, С. В. Дора, Е. В. Шляхто // Сахарный диабет. 2016. №1. С.16-23.
- 11. 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.
- 12. Газизова, Г. Р. Роль воспалительных цитокинов при диабетической нефропатии у беременных с сахарным диабетом 1-го типа / Г. Р. Газизова // Казанский мед.ж. 2013. №1. С.105-110.
- 13. Галстян, Г. Р. Эректильная дисфункция как проявление урогенитальной автономной нейропатии у больных сахарным диабетом 1 типа: эпидемиология, классификация, патофизиология, диагностика и методы лечения / Г. Р. Галстян, Я. Г. Шварц, С. А. Дубский, А. Е. Лепетухин, Р. В. Роживанов, Д. Г. Курбатов // Сахарный диабет. 2014. №2. С.126-132.
- Галяви, Р. А. Артериальная гипертензия и сахарный диабет / Р. А. Галяви, О. Ю. Михопарова, О. Б. Ощепкова, Э. Б. Фролова // Вестник современной клинической медицины. 2014. №7, Приложение 1. С.78-81.
- 15. Гацких, И. В. Анализ когнитивного статуса у пациентов с

- сахарным диабетом 2 типа / И. В. Гацких, М. М. Петрова, О. Ф. Веселова [и др.] // Сахарный диабет. 2017. №20(6). С.434-440.
- Гацких, И. В. Когнитивные нарушения при сахарном диабете 2 типа / И. В. Гацких, О. Ф. Веселова, И. Н. Брикман [и др.] // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 4. С.8.
- 17. Герасимова, Е. В. Нейрофизиология поведения: методическое пособие / Е.В. Герасимова, Ф.Ф. Валиуллина, Г.Ф. Ситдикова // Казань: Казанский университет. 2016. 49 с.
- Гланц, С. Медико-биологическая статистика: [пер. с англ.] / С.
 Гланц М.: Практика. 1999. 459 С.
- 19. Голибродо, В. А. Исследование когнитивных способностей лабораторных мышей с использованием генетических моделей: дис. канд биол. наук. МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, 2014.
- Горина, Я. В. Нейровоспаление и инсулинорезистентность при болезни Альцгеймера / Я. В. Горина, А. Б. Салмина, Н. В. Кувачева [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. 2014. №4(88). С.11-19.
- 21. Грачева, С. А. Распространенность сочетанного атеросклеротического поражения сосудов у больных сахарным диабетом / С. А. Грачева, И. И. Клефортова, М. Ш. Шамхалова // Сахарный диабет. 2012. №1. С.49-55.
- 22. Дедов, И. И. (а) Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Под редакцией И. И. Дедова, М. В. Шестаковой, А. Ю. Майорова (8 выпуск) / И. И. Дедов, М. В. Шестакова, А. Ю. Майорова // Сахарный диабет. 2017. Т.20, №1 (приложение 1). С.1-112.
- 23. Дедов, И. И. (б) Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным Федерального регистра сахарного диабета / И. И. Дедов, М.В. Шестакова, О.К. Викулова // Сахарный диабет. 2017. №20(1). –

- C.13-41.
- Драпкина, О. М. Фиброз миокарда у больных сахарным диабетом/ О. М. Драпкина, Б. Б. Гегенава // РФК. 2013. №9(1). С.62-65.
- 25. Емелин, А. Ю. Когнитивные нарушения при цереброваскулярной болезни что между нормой и деменцией? / А. Ю. Емелин // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2015. №1. С.94-98.
- 26. Есин, Р. Г. Современные представления о механизмах когнитивных расстройств при сахарном диабете / Р. Г. Есин, И. Х. Хайруллин, О. Р. Есин // Медицинский альманах. 2013. №1(25). С.135-138.
- Жармухамбетова, Л. Т. Хроническая ишемия головного мозга в сочетании с артериальной гипертензии, атеросклерозом и сахарным диабетом / Л. Т. Жармухамбетова, Р. Б. Нуржанова, К. Б. Раимкулова [и др.] // Вестник КазНМУ. 2012. №2. С.54-56.
- 28. Зайцева, М. С. Работоспособность крыс в тесте «Вынужденное плавание с грузом» и причины её вариабельности / М. С. Зайцева, Д. Г. Иванов, Н. В. Александровская // Биомедицина. 2015. №4. С.30-42.
- 29. Захаров, В.В. Современные представления о хронической недостаточности мозгового кровообращения / В. В. Захаров // Русский медицинский журнал. 2014. № 16. С.1188-1192.
- 30. Зборовский А. Б. Неблагоприятные побочные эффекты лекарственных средств [Текст] / А. Б. Зборовский, И. Н. Тюренков, Ю. Б. Белоусов. М.: МИА, 2008. 651 с.
- 31. Зухурова, М.А. Оценка нейропротективных свойств L-теанина с помощью неврологических и поведенческих тестов на разных сроках постишемического периода / М.А. Зухурова, А.С. Дайнеко, Д.С. Лупан [и др.] // Бюллетень федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова. 2013. -

- №1(18) C.39-51.
- 32. Иванникова, Е. В. Влияние факторов роста фибробластов и конечных продуктов гликирования на толщину комплекса интима-медиа у больных с ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом 2 типа / Е. В. Иванникова, В. Ю. Калашников, О. М. Смирнова [и др.] // Сахарный диабет. 2014. №2. С.47-55.
- 33. Какорин, С. В. Хроническая сердечная недостаточность у больных сахарным диабетом 2 типа / С. В. Какорин, И. А. Аверкова, А. М. Мкртумян // Международный журнал интервенционной кардиоангиологии. 2015. №40. С.52-60.
- 34. Каменская, О. В. Резервные возможности сосудистого русла у пациентов с системным атеросклерозом в сочетании с сахарным диабетом 2 типа / О. В. Каменская, И. Ю. Логинова, А. С. Клинкова, А. А. Карпенко // Сахарный диабет. 2013. №1(58). С.78-82.
- 35. Капустин, Р. В. Оксидативный стресс у беременных с сахарным диабетом / Р. В. Капустин, О. Н. Аржанова, А. В. Тиселько // Сахарный диабет. 2017. №20(6). С.461-471.
- 36. Катунина, Е. А. Гетерогенность сосудистых когнитивных нарушений и вопросы терапии / Е. А. Катунина // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2015. Т.7, №3. С.62-69.
- Кирщина, И. А. Повышение комплаентности хронических больных как аспект фармацевтической помощи / И. А. Кирщина, А. В. Солонинина, А. Д. Каткова // Вестник РУДН. Серия: Медицина. 2013. №6. С.54-57.
- 38. Клаан, Н. К. Ядерный фактор каппа в (NF-kB) в качестве мишени для действия природных противоопухолевых соединений / Н. К. Клаан, Т. А. Пронина, Л. П. Акиньшина, В. В. Решетникова // Российский биотерапевтический журнал. 2014. №1. С.3-8.

- Колотилова О. И. Дофаминергическая система мозга / О. И. Колотилова, И. И. Коренюк, Д. Р. Хусаинов, И. В. Черетаев // Вестник БГУ. 2014. №4. С.97-106.
- Кондратьева, Л. В. Сахарный диабет и гипергликемия у больных ревматоидным артритом / Л. В. Кондратьева, Т. А. Панафидина, Е. В. Герасимова [и др.] // Современная ревматология. 2014. №3. С.23-27.
- 41. 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.
- 42. Кошкарбаева, А. К. Инсулинорезистентность как ведущий фактор риска ишемической болезни сердца при сахарном диабете 2 типа / А. К. Кошкарбаева, С. Н. Афанасьева // Архивъ внутренней медицины. 2013. №5. С.35-39.
- 43. Кравцова, А. Н. Процесс обучения гипоксированных крыс в условиях коррекции коменатом калия / А. Н. Кравцова, А. А. Кравцов, М. Л. Золотавина // Успехи современной науки. 2016. Т.3, №4. С.125-129.
- 44. Кукес, В. Г. Клиническая фармакология / под ред. В. Г. Кукеса, Д. А. Сычева М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. С.1024.
- 45. Лаптев, Д. Н. Аритмогенный эффект гипогликемии / Д. Н. Лаптев, И. А. Шмушкович // Сахарный диабет. 2012. №1. С.25-30.
- 46. Лаптев, Д. Н. Связь гипогликемии и вариабельности гликемии с автономной дисфункцией у детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа / Д. Н. Лаптев // Сахарный диабет. 2014. №4. С.87-92.
- 47. Левин, О. С. Когнитивные нарушения при сахарном диабете типа
 2 / О. С. Левин, Ф. Н. Ильясова // Consilium Medicum. 2012. №9. С.92-97.

- 48. Левин, О.С. Когнитивные нарушения при сахарном диабете и метаболическом синдроме / О. С. Левин // СТПН. 2015. №4. С.18-25.
- 49. Литвиненко, Е. А. Уровень эндотоксемии и цитокиновый статус у пациентов с сахарным диабетом 2 типа и неалкогольной жировой болезнью печени / Е. А. Литвиненко, П. Н. Боднар, Н. И. Лисяний, Л. Н. Бельська // Журнал ГрГМУ. 2014. №4(48). С.86-89.
- 50. 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.
- Макишева, Р. Т. Пути защиты организма от повреждения клеток при сахарном диабете / Р. Т. Макишева // Вестник новых медицинских технологий. - 2016. - №1. - С.144-152.
- 52. Максименко, А. В. Эндотелиальный гликокаликс— значимая составная часть двойного защитного слоя сосудистой стенки: диагностический индикатор и терапевтическая мишень / А. В. Максименко // Кардиологический вестник. 2016. №3. С.94-100.
- 53. Матвеева, М. В. Перспективы когнитивной реабилитации пациентов с сахарным диабетом / М. В. Матвеева, Ю. Г. Самойлова, Н. Г. Жукова, О. А. Олейник, М. А. Ротканк // Ожирение и метаболизм. 2016. №4. С.3-7
- 54. Матвеева, М. В. Таупатия и когнитивные нарушения при экспериментальном сахарном диабете / М. В. Матвеева, Ю. Г. Самойлова, Н. Г. Жукова [и др.] // Сахарный диабет. 2017. №3. С.181-184.
- 55. Мельникова, О. Г. Клинические и психологические аспекты гипогликемии при сахарном диабете / О. Г. Мельникова, А. Ю. Майоров // Сахарный диабет. 2010. №3. С.46-50.

- 56. Мельникова, Ю. С. Эндотелиальная дисфункция как центральное звено патогенеза хронических болезней / Ю. С. Мельникова, Т. П. Макарова // Казанский мед.ж. 2015. №96(4). С.659-665.
- 57. Мирзоева, Л. А. Повышение спонтанной и индуцированной секреции провоспалительного цитокина ФНО-α моноцитамимакрофагами крови больных сахарным диабетом 2-го типа / Л. А. Мирзоева, Н. Г. Никифоров, В. А. Аладинский [и др.] // Пробл. эндокр. 2014. №5. С.22-25.
- 58. Мироненко, М. О. Современные направления в лечении диабетической энцефалопатии / М. О. Мироненко, Т. В. Мироненко // Вестник ВГМУ. 2013. №2. С.19-30.
- 59. Мохорт, Е. Г. Когнитивные нарушения при сахарном диабете 2-го типа / Е. Г. Мохорт, Е. А. Холодова, Т. В. Мохорт // Здравоохранение (Минск). 2014. №7. С.23-29.
- 60. Никольская, К. А. Системно-информационные аспекты познавательной деятельности позвоночных: дис. д-ра биол. наук. МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, 2010.
- 61. Островская, Р.У. Методические рекомендации по изучению нейролептической 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.
- 62. Патракеева, Е. М. В поисках феномена Сомоджи / Е. М. Патракеева, К. А. Соловьева, Н. С. Новоселова, А. Г. Залевская // Сахарный диабет. 2016. №1. С.80-88.
- 63. Погорелова, А. С. Гипогликемия как фактор внезапной смерти /А. С. Погорелова // Медицинский совет. 2016. №4. С.96-99.
- 64. Раскина, К. Инкретины: роль в регуляции углеводного обмена / К. Раскина // Актуальная эндокринология. 2015. №6. С.2.

- 65. Ратушняк, А. С. Проблемы и перспективы когнитивных исследований и разработок / А. С. Ратушняк, Т. А. Запара, А. Л. Проскура // Сложность. Разум. Постнеклассика. 2013. №4. С.5-13.
- 66. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica / О.Ю. Реброва. М.: Медиасфера. 2006. 312 с.
- 67. Салмина, А. Б. Инсулин и инсулинорезистентность: новые молекулы-маркеры и молекулы-мишени для диагностики и терапии заболеваний центральной нервной системы / А. Б. Салмина, Н. А. Яузина, Н. В. Кувачева [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. 2013. №5. С.104-118.
- 68. Самотруева, М. А. Экспериментальный модели поведения / М. А. Самотруева, Д. Л. Теплый, И. Н. Тюренков // Естественный науки.
 2009. №2(27). С.140-152.
- 69. Саприна, Т. В. Панкреатические и экстрапанкреатические эффекты инкретинов и перспективы изучения энтероинсулярной гормональной системы у беременных женщин при гестационном нарушении углеводного обмена / Т. В. Саприна, Е. С. Тимохина, Н. Н. Мусина [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. 2013. №3. С.132-147.
- Сидоров, П. И. Синергетическая биопсихосоциодуховная концепция ментальной эпидемии сахарного диабета / П. И. Сидоров, Е. П. Совершаева // Экология человека. 2015. №8. С.38-47.
- 71. 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.
- 72. Сосина, В. Б. Когнитивные нарушения при сахарном диабете / В.

- Б. Сосина, В. В. Захаров, И. А. Строков, Н. В. Вахнина / Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2017/ №9(1). С.90–95.
- 73. 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.
- 74. 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.
- 75. 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.
- 76. Старостина, Е. Г. Гипогликемия и гипогликемическая кома / Е. Г. Старостина // Медицинский совет. 2013. №5-6. С.6-10.
- 77. Старостина, Е. Г. (а) Клинико-лабораторные корреляты уровня интеллекта (IQ) у больных сахарным диабетом 2-го типа и ожирением / Е. Г. Старостина, М. Н. Володина, А. Е. Бобров // Альманах клинической медицины. 2015. №1. С.87-94.
- 78. Старостина, Е. Г. (б) Роль комплаентности в ведении больных диабетом / Е. Г. Старостина // Регулярные выпуски «РМЖ». 2015. №8. С.477.
- 79. Сычев, Д. А. Полипрагмазия в клинической практике: проблема и решения / под общ. ред. Д. А. Сычева; науч. ред. В. А. Отделенов. СПб.: ЦОП «Профессия», 2016. 224 с.
- 80. Татарникова, О. Г. Бета-амилоид и тау-белок: структура, взаимодействие и прионоподобные свойства / О. Г. Татарникова,

- М. А. Орлов, Н. В. Бобкова // Успехи биологическиой химии. 2015. T.55. C.351-390.
- 81. Тюренков, И. Н. Десять новых мишеней для разработки лекарственных средств для лечения сахарного диабета 2 типа и метаболического синдрома / И. Н. Тюренков, Д. В. Куркин, Е. В. Волотова [и др.] // Сахарный диабет. 2015. №1. С.101-109.
- 82. Тюренков, И. Н. (а) Изменение скорости мозгового кровообращения у крыс при экспериментальном моделировании стеноза общих сонных артерий / И. Н. Тюренков, Д. В. Куркин, Е. Н. Морковин, Д. В. Верхоляк, Д. А. Бакулин, Е.В. Волотова // Вестник ВолГМУ. 2017. №1 (61). С.36-39.
- 83. И. H. Тюренков, (б) свойства Нейропротективные инкретиномиметиков при ишемии головного мозга И нейродегенеративных заболеваниях / И. Н. Тюренков, Д. А. E. B. Бакулин, Д. В. Куркин, Волотова Проблемы эндокринологии. – 2017. - №63 (1). – С.58-67.
- 84. Тюренков, И. Н. (а) Спектр психофармакологических свойств новых производных [4-оксихинолин-3(4H)-ил]уксусной кислоты / И. Н. Тюренков, Ю. В. Арчакова, Е. Г. Глухова [и др.] // Успехи современного естествознания. 2016. №3. С.9-12.
- 85. Тюренков, И. Н. (б) Влияние агониста рецептора gpr119 на уровень глюкозы, массу тела и потребление пищи у животных с ожирением, обусловленным высокожировой и углеводной диетой / И. Н. Тюренков, Д. В. Куркин, Д. А. Бакулин, Е. В. Волотова, М. А. Шафеев // Пробл. эндокр. 2016. №1. С. 44-49.
- 86. 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.
- 87. Фирсов, А. А. Когнитивные нарушения при сахарном диабете у

- лиц пожилого возраста / А. А. Фирсов, Е. А. Мащенко // Архивъ внутренней медицины. 2014. №4. С.26-31.
- 88. Хасанова, Д. Р. Значение атеросклеротического стенозирующего поражения брахиоцефальных артерий в формировании когнитивных нарушений / Д. Р. Хасанова, Ю. В. Житкова, А. А. Гаспарян // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2015. №1. С.43-48.
- 89. Чак, Т. А. Влияние гена ангиотензинпревращающего фермента на развитие нейрососудистых осложнений при сахарном диабете 2 типа / Т. А. Чак, Е. А. Павлющик, А. В. Хапалюк [и др.] // Медицинские новости. 2015. №6(249). С.53-56.
- 90. Черников, А. А. Роль механизмов «Метаболической памяти» в развитии и прогрессировании сосудистых осложнений сахарного диабета / А. А. Черников, А. С. Северина, М. Ш. Шамхалова [и др.] // Сахарный диабет. 2017. №2. С.126-134.
- 91. Шабанов, П. Д. Влияние фенамина на поведенческие компоненты обсессивно-компульсивного и аддиктивного игрового поведения в тесте закапывания шариков у крыс / П. Д. Шабанов, А. А. Лебедев, Н. Д. Якушина, А. Г. Пшеничная, Е. Р. Бычков // Обзоры по клинич. фармакол. и лек. терапии. 2016. №3. С.46-52.
- 92. Шавловская, О. А. Диабетическая полинейропатия: эффективность метаболической терапии / О. А. Шавловская // Медицинский совет. 2014. №5. С.44-49.
- 93. Шведкова, Т. А. Особенности когнитивного и психоэмоционального статуса пациентов с сахарным диабетом 2 типа / Т. А. Шведкова, Г. А. Утина, Е. М. Безина // Вестник КазНМУ. 2015. №4. С.300-302.
- 94. Шестакова, М. В. Гипогликемия у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа: безопасное решение опасной проблемы / М. В. Шестакова, Ю. Ш. Халимов // Терапевтический архив. 2013. -

- T.85, №12. C.144-150.
- 95. Шестакова, М. В. Опыт применения ситаглиптина (первого ингибитора ДПП-4) в лечении сахарного диабета 2 типа в Российской Федерации: результаты наблюдательной программы «Диа-Да» / М. В. Шестакова // Сахарный диабет. 2010. №3. С.57-60.
- 96. Шестакова, М. В. Сахарный диабет и эндотелиальная дисфункция
 / М. В. Шестакова, И. Р. Ярек-Мартынова // Сахарный диабет. 2004. Т.7. №2. С.48-52.
- 97. Шмонин, А. А. (а) Современная терапия хронического нарушения мозгового кровообращения. Часть 1 / А. А. Шмонин, В. С. Краснов, И. А. Шмонина, Е. В. Мельникова // Архивъ внутренней медицины. 2014. №3(17). С.12-17.
- 98. Шмонин, А. А. (б) Современная терапия хронического нарушения мозгового кровообращения. Часть 2 / А. А. Шмонин, В. С. Краснов, И. А. Шмонина, Е. В. Мельникова // Архивъ внутренней медицины. 2014. №4. С.4-8.
- 99. Шпаков, А. О. Гормональные системы мозга и сахарный диабет 2-го типа / А. О. Шпаков, К. В. Деркач. СПб. : Изд-во Политехн. ун-та, 2015. 252 с.
- 100. Шурдумова, М. Г. Патогенетические предпосылки электрической нестабильности миокарда у больных артериальной гипертензией и сахарным диабетом / М. Г. Шурдумова // Медицинский вестник Юга России. 2015. №3. С.8-17.
- 101. 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.] // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2015. Vol.353, №3. P.496-504.
- 102. Albelda, N. Current animal models of obsessive compulsive disorder:

 An update / N. Albelda, D. Joel // Neuroscience. 2012. Vol.211. -

- P.83-106.
- 103. 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.302-12.
- 104. Areosa, S. A. Effect of the treatment of Type 2 diabetes mellitus on the development of cognitive impairment and dementia / S. A. Areosa,
 R. W. M. Vernooij, H. M. González-Colaço [et al.] // Cochrane
 Database of Systematic Reviews. 2017. Vol.6, Art. № CD003804.
- 105. Arvanitakis, Z. Relation of cerebral vessel disease to Alzheimer's disease dementia and cognitive function in elderly people: a cross-sectional study / Z. Arvanitakis, A. W. Capuano, S. E. Leurgans [et al.] // Lancet Neurol. 2016. Vol.15, №9. P.934-943.
- 106. 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 Discovery Today. 2016. Vol.21, №5. P.802–818.
- 107. Battson, M. L. Endoplasmic reticulum stress and the development of endothelial dysfunction / M. L. Battson, D. M. Lee, C. L. Gentile // Am J Physiol Heart Circ Physiol. - 2017. - Vol.312. - P.355–367.
- 108. Bazyar, S. Neurocognitive sparing of desktop microbeam irradiation / S. Bazyar, C. R. Inscoe, T. Benefield [et al.] // Radiat Oncol. - 2017. -Vol.12. - P.127.
- 109. Bertoluci, M. C. Endothelial dysfunction as a predictor of cardiovascular disease in type 1 diabetes / M. C. Bertoluci, C. V. Gislaine, A. M. V. da Silva [et al.] // World J Diabetes. 2015. Vol.6, №5. P.679–692.
- 110. Biessels, G. J. Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction / G. J. Biessels, L. P. Reagan // Nat Rev Neurosci. 2015. Vol.16, №11. P.660-671.

- 111. Blázquez, E. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for States related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease / E. Blázquez, E. Velázquez, V. Hurtado-Carneiro [et al.] // Front Endocrinol (Lausanne). 2014. Vol.5. P.161.
- 112. 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.
- 113. Bolo, N. R. Functional Connectivity of Insula, Basal Ganglia, and Prefrontal Executive Control Networks during Hypoglycemia in Type 1 Diabetes / N. R. Bolo, G. Musen, D. C. Simonson [et al.] // J Neurosci. 2015. Vol.35, №31. P.11012–11023.
- 114. Bowe, J. E. Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models / J. E. Bowe, Z. J. Franklin, A. C. Hauge-Evans [et al.] // J Endocrinol. 2014. Vol.222, №3. P.13-25.
- 115. Brabazon, F. Intranasal insulin treatment of an experimental model of moderate traumatic brain injury / F. Brabazon, C M. Wilson, S. Jaiswal [et al.] // J Cereb Blood Flow Metab. - 2017. - Vol.37, №9. -P.3203-3218.
- 116. Bracko, O. 3-Nitropropionic acid-induced ischemia tolerance in the rat brain is mediated by reduced metabolic activity and cerebral blood flow / O. Bracko, V. Di Pietro, G. Lazzarino [et al.] // J Cereb Blood Flow Metab. 2014. Vol.34, №9. P.1522–1530.
- 117. 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.
- 118. Chafeev, M. A. Discovery of ZB40-0016 a Novel GPR119 Agonist for Type 2 Diabetes Treatment / M.A. Chafeev, R.N. Karapetian, I.N. Tyurenkov, E.V. Volotova // 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry. Novosibirsk, Russia, July 5-10, 2015. P.69.

- 119. Chatterjee, S. Type 2 diabetes as a risk factor for dementia in women compared with men: a pooled analysis of 2.3 million people comprising more than 100,000 cases of dementia / S. Chatterjee, S. A. E. Peters, M. Woodward [et al.] // Diabetes Care. 2016. Vol.39, №2. P.300–307.
- 120. Chu Z.-L, Carroll C., Alfonso J., Gutierrez V., He H., Lucman A., Pedraza M., Mondala H., Gao H., Bagnol D., Chen R., Jones R. M., Behan D. P., Leonard J. A role for intestinal endocrine cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic peptide release. Endocrinology 2008, 149(5): P. 2038 –2047.
- 121. Crystal, H. A. Associations of cerebrovascular and Alzheimer's disease pathology with brain atrophy / H. A. Crystal, J. A. Schneider, D. A. Bennett [et al.] // Curr Alzheimer Res. 2014. Vol.11, №4. P.309-16.
- 122. Cui, X. Multi-Scale Glycemic Variability: A Link to Gray Matter Atrophy and Cognitive Decline in Type 2 Diabetes / X. Cui, A. Abduljalil, B. D. Manor [et al.] // PLoS One. 2014. Vol.9, №1. P.e86284.
- 123. Dailey, M. J. Glucagon-like peptide 1 and appetite / M. J. Dailey, T.
 H. Moran // Trends Endocrinol Metab. 2013. Vol.24, №2. P.85–91.
- 124. De Graaf, C. Glucagon-Like Peptide-1 and Its Class B G Protein—Coupled Receptors: A Long March to Therapeutic Successes / C. de Graaf, D. Donnelly, D. Wootten [et al.] // American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. Pharmacol Rev. 2016. Vol.68, №4. P.954–1013.
- 125. De Silva, T. M. Cerebral Small Vessel Disease: Targeting Oxidative Stress as a Novel Therapeutic Strategy? / T. M. de Silva, A. A. Miller // Front Pharmacol. 2016. Vol.7. P.61.

- 126. De Simone, G. Target organ damage and incident type 2 diabetes mellitus: the Strong Heart Study / G. de Simone, W. Wang, L. G. Best [et al.] // Cardiovasc Diabetol. 2017. Vol.16. P.64.
- 127. Devuyst, O. Glycocalyx: The Fuzzy Coat Now Regulates Cell Signaling / O. Devuyst // Perit Dial Int. 2014. Vol.34, №6. P.574–575.
- 128. Fedele, E. Glucagon-Like Peptide 1, Neuroprotection and Neurodegenerative Disorders / E. Fedele, R. Ricciarelli, C. Rebosio // J Biomol Res Ther. 2016. Vol.5. P.3.
- 129. Feinkohl, I. Cardiovascular risk factors and cognitive decline in older people with type 2 diabetes / I. Feinkohl, M. Keller, C. M. Robertson [et al.] // Diabetologia. 2015. Vol.58, №7. P.1637–1645.
- 130. Finan, B. Emerging opportunities for the treatment of metabolic diseases: glucagon-like peptide-1 based multi-agonists / B. Finan, C. Clemmensen, T. D. Müller // Mol Cell Endocrinol. 2015. Vol.15 №418(1). P.42-54.
- 131. Gejl, M. In Alzheimer's Disease, 6-Month Treatment with GLP-1 Analog Prevents Decline of Brain Glucose Metabolism: Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial / M. Gejl, A. Gjedde, L. Egefjord [et al.] // Front Aging Neurosci. 2016. Vol.8 P.108.
- 132. Gengler, S. Val(8)GLP-1 rescues synaptic plasticity and reduces dense core plaques in APP/PS1 mice / S. Gengler, P. L McClean, R. McCurtin [et al.] // Neurobiol Aging. 2012. Vol.33, №2. P.265-76.
- 133. Golden, S. H. Depressive symptoms and the risk of type 2 diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities study / S. H. Golden, J. E. Williams, D. E. Ford [et al.] // Diabetes Care. 2004. Vol.27, №2. P.429-35.
- 134. Goodman M. L., Dow J., Van Vilet A. A., Pieszko A., Lockton J. A. Orally administered GPR119 agonist PSN821 shows clinically significant glucose lowering and other potential cardiometabolic

- benefits in patients with type 2 diabetes. Diabetes epidemic demands global action: from the un summit on non-communicable diseases. The SA Journal Diabetes & Vascular Disease Vol 8 No 4 (November 2011) P. 36-37.
- 135. Groeneveld, O. N. Potentials of incretin- based therapies in dementia and stroke in type 2 diabetes mellitus / O. N. Groeneveld, J. Kappelle,
 G. J. Biessels // J Diabetes Investig. 2016. Vol.7, №1. P.5–16.
- 136. 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.376-84.
- 137. Guo, Z. Long-term treatment with intranasal insulin ameliorates cognitive impairment, tau hyperphosphorylation, and microglial activation in a streptozotocin-induced Alzheimer's rat model / Z. Guo, Y. Chen, Y.-F. Mao [et al.] // Sci Rep. 2017. Vol.7. P.45971.
- 138. Hammersjö, R. Esophageal and Gastric Dysmotilities are Associated with Altered Glucose Homeostasis and Plasma Levels of Incretins and Leptin / R. Hammersjö, B. Roth, P. Höglund [et al.] // Rev Diabet Stud. 2016. Vol.13, №1. P.79–90.
- 139. Harkavyi, A. Glucagon-like peptide 1 receptor stimulation as a means of neuroprotection / A. Harkavyi, P. S. Whitton // Br J Pharmacol. 2010. Vol.159, №3. P.495–501.
- 140. Hase, Y. Effects of environmental enrichment on white matter glial responses in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion / Y. Hase, L. Craggs, M. Hase [et al.] // J Neuroinflammation. 2017. -Vol.14. - P.81.
- 141. Hattori, Y. A novel mouse model of ischemic carotid artery disease / Y. Hattori, A. Kitamura, K. Nagatsuka, M. Ihara // PLoS One. 2014. Vol.9, №6. P.e100257.
- 142. Hattori, Y. Gradual carotid artery stenosis in mice closely replicates

- hypoperfusive vascular dementia in humans / Y. Hattori, J. Enmi, S. Iguchi [et al.] // J Am Heart Assoc. 2016. Vol.5, №2. P.e002757.
- 143. Hölscher, C. First clinical data of the neuroprotective effects of nasal insulin application in patients with Alzheimer's disease / C. Hölscher // Alzheimers Dement. 2014. Vol.10, №1. P.33-37.
- 144. Hunt, K. J. Elevated carotid artery intima-media thickness levels in individuals who subsequently develop type 2 diabetes / K. J. Hunt, K. Williams, D. Rivera [et al.] // Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003. Vol.23, №10. P.1845-50.
- 145. Jha, S. K. p38 MAPK and PI3K/AKT Signalling Cascades inParkinson's Disease / S. K. Jha, N. K. Jha, R. Kar [et al.] // Int J Mol Cell Med. 2015. Vol.4, №2. P.67–86.
- 146. Joel, D. Current animal models of obsessive compulsive disorder: a critical review. / D. Joel // Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2006. Vol.30, №3. P.374-88.
- 147. Kalra, S. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes: Past, present, and future / S. Kalra, M. P. Baruah, R K. Sahay [et al.] // Indian J Endocrinol Metab. 2016. Vol.20, №2. P.254–267.
- 148. Kimura, R. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) protects against methylglyoxal-induced PC12 cell apoptosis through the PI3K/Akt/mTOR/GCLc/redox signaling pathway / R. Kimura, M. Okouchi, H. Fujioka [et al.] // Neuroscience. 2009. Vol.162, №4. P.1212-9.
- 149. Kitagishi, Y. Dietary regulation of PI3K/AKT/GSK-3β pathway in Alzheimer's disease / Y. Kitagishi, A. Nakanishi, Y. Ogura, S. Matsuda // Alzheimers Res Ther. 2014. Vol.6, №3. P.35.
- 150. Kleinridders, A. Insulin Action in Brain Regulates Systemic Metabolism and Brain Function / A. Kleinridders, H. A. Ferris, W. Cai, C. R. Kahn // Diabetes. 2014. Vol.63, №7. P.2232–2243.

- 151. Kosaraju, J. (a) Saxagliptin: A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor ameliorates streptozotocin induced Alzheimer's disease / J. Kosaraju,
 G. C. Chakravarthi, R. B. Khatwalb [et al.] // Neuropharmacology. 2013. Vol.72. P.291-300.
- 152. Kosaraju, J. Linagliptin, a Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, Mitigates Cognitive Deficits and Pathology in the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease / J. Kosaraju, R. Holsinger, L. Guo [et al.] // Mol Neurobiol. 2017. Vol.54, №8. P.6074-6084.
- 153. Kosarajua, J. (6) Vildagliptin: an anti-diabetes agent ameliorates cognitive deficits and pathology observed in streptozotocin-induced Alzheimer's disease / J. Kosaraju, V. Murthyd, R. B. Khatwalb [et al.] // Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2013. Vol.65. P.1773–1784.
- 154. Kou, Z.-Z. Alterations in the neural circuits from peripheral afferents to the spinal cord: possible implications for diabetic polyneuropathy in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats / Z.-Z. Kou, C.-Y. Li, J.-C. Hu [et al.] // Front Neural Circuits. 2014. Vol.8. P.6.
- 155. LaRue, S. Evaluation of the Dual-Chamber Pen Design for the Injection of Exenatide Once Weekly for the Treatment of Type 2 Diabetes / S. LaRue, J. Malloy // J Diabetes Sci Technol. 2015. Vol.9, №4. P.815–821.
- 156. Leiter, E. H. Selecting the 'right' mouse model for metabolic syndrome and type 2 diabetes research / E. H. Leiter // Methods Mol Biol. 2009. Vol.560. P.1–17.
- Li, Z. Exendin-4 Protects Mitochondria from Reactive Oxygen Species Induced Apoptosis in Pancreatic Beta Cells / Z. Li, Z. Zhou,
 G. Huang [et al.] // PLoS One. 2013. Vol.8, №10. P.e76172.
- 158. Lim, D.-M. Difference in protective effects of GIP and GLP-1 on endothelial cells according to cyclic adenosine monophosphate response / D.-M. Lim, K.-Y. Park. W.-M. Hwang [et al.] // Exp Ther

- Med. 2017. Vol.13, №5. P.2558-2564.
- 159. Liuc, W. Neuroprotective effects of lixisenatide and liraglutide in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease / W. Liuc, J. Jalewaa, M. Sharmaa [et al.] // Neuroscience. 2015. Vol.303. P.42–50.
- 160. Lustman, P. J. Depression in diabetic patients: the relationship between mood and glycemic control / P. J. Lustman, R. E. Clouse // J Diabetes Complications. 2005. Vol.19, №2. P.113-22.
- 161. Matin, N. Bilateral common carotid artery stenosis in normotensive rats impairs endothelium-dependent dilation of parenchymal arterioles / N. Matin, C. Fisher, W. F. Jackson, A. M. Dorrance // Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2016. Vol.310, №10. P.1321–1329.
- 162. Miles, W. R. Psychologic tests applies in diabetic patients / W. R. Miles, H. F. Root // Arch. Int. Med. 1922. Vol.30. P.767–770.
- 163. Mitra, R. Glycocalyx in Atherosclerosis-Relevant Endothelium Function and as a Therapeutic Target / R. Mitra, G. L. O'Neil, I. C. Harding [et al.] // Curr Atheroscler Rep. 2017. Vol.19, №12. P.63.
- 164. More, S. V. Promising cannabinoid-based therapies for Parkinson's disease: motor symptoms to neuroprotection / S. V. More, D.-K. Choi // Mol Neurodegener. 2015. Vol.10. P.17.
- 165. Mortby, M. E. High "normal" blood glucose is associated with decreased brain volume and cognitive performance in the 60s: the PATH through life study / M. E. Mortby, A. L. Janke, K. J. Anstey [et al.] // PLoS One. 2013. Vol.8, №9. P.e73697.
- 166. Naicker, K. Type 2 Diabetes and Comorbid Symptoms of Depression and Anxiety: Longitudinal Associations With Mortality Risk / K. Naicker, J. A. Johnson, J. C. Skogen [et al.] // Diabetes Care. 2017. Vol.40, №3. P.352-358.
- 167. Nassimisadeh, M. Reduced negative surface charge on arterial endothelium explains accelerated atherosclerosis in type 2 diabetic

- patients / M. Nassimisadeh, H. Ashrafian, N. E. Drury [et al.] // Diab Vasc Dis Res. 2010. Vol.7, №3. P.213-5.
- 168. Niu, B. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist exendin-4 protects against interleukin-1β-mediated inhibition of glucose-stimulated insulin secretion by mouse insulinoma β cells / B. Niu, C. Li, H. Su [et al.] // Exp Ther Med. 2017. Vol.14, №3. P.2671–2676.
- 169. Nunez, D. J. Gut hormone pharmacology of a novel GPR119 agonist (GSK1292263), metformin, and sitagliptin in type 2 diabetes mellitus: results from two randomized studies / D. J. Nunez, M. A. Bush, D. A. Collins [et al.] // PLoS ONE. 2014. Vol.9, №4. P.e92494.
- 170. Ohtake, N. Exendin-4 promotes the membrane trafficking of the AMPA receptor GluR1 subunit and ADAM10 in the mouse neocortex / N. Ohtake, M. Saito, M. Eto [et al.] // Regul Pept. 2014. Vol.190. P.1-11.
- 171. Okoduwa, S. I. Appropriate Insulin Level in Selecting Fortified Diet-Fed, Streptozotocin-Treated Rat Model of Type 2 Diabetes for Anti-Diabetic Studies / S. I. Okoduwa, I. A. Umar, D. B. James [et al.] // PLoS One. 2017. Vol.12, №1. P.e0170971.
- 172. Orduna, V. Timing behavior in streptozotocin-induced diabetic rats /
 V. Orduna, E. Hong, A. Bouzas // Behav Brain Res. 2011. Vol.10,
 №224(1). P.189-94.
- 173. Pagnozzi, L. A. Mechanotransduction Mechanisms in Mitral Valve Physiology and Disease Pathogenesis / L. A. Pagnozzi, J. T. Butcher // Front Cardiovasc Med. 2017. Vol.4. P.83.
- 174. Park, K.-H. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches / K.-H. Park, W. J. Park // J Korean Med Sci. 2015. Vol.30, №9. P.1213-1225.
- 175. Pechlivanova, D. Intracerebroventricular infusion of an Angiotensin AT2 receptor agonist Novokinin aggravates some diabetes mellitusinduced alterations in Wistar rats / D. Pechlivanova, K. Petrov, P.

- Grozdanov [et al.] // Can J Physiol Pharmacol. 2017. Vol.13. P.e0428.
- 176. Perales-Torres, A. L. Diabetes and type of diet as determinant factor in the progression of atherosclerosis / A. L. Perales-Torres, O. Castillo-Ruíz, M. T. Castañeda Licón [et al.] Arch Cardiol Mex 2016. Vol.86, №4. P.326-334.
- 177. Peterson, J. M. Longitudinal analysis of hepatic transcriptome and serum metabolome demonstrates altered lipid metabolism following the onset of hyperglycemia in spontaneously diabetic biobreeding rats / J. M. Peterson, S. E. Regnell, M. J. Hessner [et al.] // PLoS One. 2017. Vol.12, №2. P.e0171372.
- 178. Raffield, L. M. Analysis of the relationships between type 2 diabetes status, glycemic control, and neuroimaging measures in the Diabetes Heart Study Mind / L. M. Raffield, A. J. Cox, B. I. Freedman [et al.] // Acta Diabetol. 2016. Vol.53, №3. P.439-447.
- 179. Roberts, B. MBX-2982, a novel GPR119 agonist, shows greater efficacy in patients with the most glucose intolerance: results of a phase 1 study with an improved formulation. Congress: 70th Scientific Sessions (2010) Category: Pharmacologic Treatment of Diabetes or its Complications. Abstract Number: 603-P.
- 180. Rosenfeld, C. S. Barnes maze testing strategies with small and large rodent models / C. S. Rosenfeld, S. A. Ferguson // J Vis Exp. 2014. Vol.84. P.51194.
- 181. Rush, W. A. Depression in patients with diabetes: does it impact clinical goals? / W. A. Rush, R. R. Whitebird, M. R. Rush [et al.] // J Am Board Fam Med. 2008. Vol.21, №5. P.392-7.
- 182. Sanchez-Margalet, V. Evidence That Multiple Defects in Lipid Regulation Occur before Hyperglycemia during the Prodrome of Type-2 Diabetes / V. Sanchez-Margalet, S. G. Anderson, W. B. Dunn [et al.] // PLoS One. 2014. Vol.9, №9. P.e103217.

- 183. Sayd, A. Systemic Administration of Oleoylethanolamide Protects from Neuroinflammation and Anhedonia Induced by LPS in Rats / A. Sayd, M. Antón, F. Alén // Int J Neuropsychopharmacol. 2015. Vol.18, №6. P.pyu111.
- 184. Sebire S. J., Toumpakari Z., Turner K. M., Cooper A. R., Page A. S., Malpass A., Andrews R. C. "I've made this my lifestyle now": a prospective qualitative study of motivation for lifestyle change among people with newly diagnosed type two diabetes mellitus. BMC Public Health. 2018 Jan 31;18(1):204.
- 185. Semenkovich, K. Depression in type 2 diabetes mellitus: prevalence, impact, and treatment / K. Semenkovich, M. E. Brown, D. M. Svrakic [et al.] // Drugs. 2015. Vol.75, №6. P.577-87.
- 186. Shah, M. Effects of GLP-1 on appetite and weight / M. Shah, A. Vella // Rev Endocr Metab Disord. 2014. Vol.15, №3. P.181–187.
- 187. Shah, U. GPR119 agonists for the potential treatment of type 2 diabetes and related metabolic disorders / U. Shah, T. J. Kowalski // Vitamins and Hormones. 2010. Vol.84. P.415-442.
- 188. Shibata, M. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion / M. Shibata, R. Ohtani, M. Ihara, H. Tomimoto // Stroke. 2004. Vol.35, №11. P.2598-2603.
- 189. Shimizu, R. Difference in glucose intolerance between C57BL/6J and ICR strain mice with streptozotocin/nicotinamide-induced diabetes / R. Shimizu, F. Sakazaki, T.Okuno [et al.] // Biomed Res. 2012. Vol.33, №1. P.63-6.
- 190. Simó, R. Cognitive impairment and dementia: a new emerging complication of type 2 diabetes-The diabetologist's perspective / R. Simó, A. Ciudin, O. Simó-Servat [et al.] // Acta Diabetol. 2017. Vol.54, №5. P.417-424.
- 191. Sonnen, J. A. Different patterns of cerebral injury in dementia with or without diabetes / J. A. Sonnen, E. B. Larson, K. Brickell [et al.] //

- Arch. Neurol. 2009. Vol.66. P.315-322.
- 192. Stadlbauer, U. Administration of the Y2 Receptor Agonist PYY3-36 in Mice Induces Multiple Behavioral Changes Relevant to Schizophrenia
 / U. Stadlbauer, W. Langhans, U. Meyer // Neuropsychopharmacology.
 2013. Vol.38, №12. P.2446–2455.
- 193. Tirabassi, R. S. The BBZDR/Wor Rat Model for Investigating the Complications of Type 2 Diabetes Mellitus / R. S. Tirabassi, J. F. Flanagan, T. Wu, E. H. Kislauskis, P. J. Birckbichler, D. L. Guberski // ILAR Journal. − 2004. − Vol.45, №3. − P.292–302.
- 194. Toth, P. Functional vascular contributions to cognitive impairment and dementia: mechanisms and consequences of cerebral autoregulatory dysfunction, endothelial impairment, and neurovascular uncoupling in aging / P. Toth, S. Tarantini, A. Csiszar [et al.] // Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2017. Vol.312, №1. P.1–20.
- 195. Tramutola, A. Modulation of GLP-1 signaling as a novel therapeutic approach in the treatment of Alzheimer's disease pathology / A. Tramutola, A. Arena, C. Cini [et al.] // Expert Rev Neurother. 2017. Vol.17, №1. P.59-75.
- 196. Tsai, C.-K. Increased risk of cognitive impairment in patients with components of metabolic syndrome / C.-K.Tsai, T.-W. Kao, J.-T. Lee [et al.] // Medicine (Baltimore). 2016. Vol.95, №36. P.e4791.
- 197. Umegaki, H. The Associations among Insulin Resistance, Hyperglycemia, Physical Performance, Diabetes Mellitus, and Cognitive Function in Relatively Healthy Older Adults with Subtle Cognitive Dysfunction / H. Umegaki, T. Makino, K. Uemura [et al.] // Front Aging Neurosci. 2017. Vol.23, №9. P.72.
- 198. Van Sloten, T. T. Vascular dysfunction: At the heart of cardiovascular disease, cognitive impairment and depressive symptoms / T. T. van Sloten // J. Vascular surgery. 2017. Vol.19. P.18-23
- 199. Vancampfort, D. Diabetes mellitus in people with schizophrenia,

- bipolar disorder and major depressive disorder: a systematic review and large scale meta- analysis / D. Vancampfort, C. U. Correll, B. Galling [et al.] // World Psychiatry. 2016. Vol.15, №2. P.166–174.
- 200. Volpe, C. M. O. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications / C. M. O. Volpe, P. H. Villar-Delfino, P. M. F. dos Anjos, J. A. Nogueira-Machado // Cell Death Dis. − 2018. − Vol.9, №2. − P.119.
- 201. Wacker, D. A. Discovery of 5-cloro-4-((1-(5-chloropyrimidin-2-yl)piperidin-4-yl)oxy)-1-(2-fluoro-4-(methylsulfonyl)phenyl)pyridin-2(1H)-one (BMS-903452), an antidiabetic clinical candidate targeting GPR119 / D. A. Wacker, Y. Wang, M. Broekema, K. Rossi, S. O'Connor, Z. Hong [et al.] // J. Med. Chem. 2014. Vol.57. P. 7499–7508.
- 202. Wang, F. Long-term subclinical hyperglycemia and hypoglycemia as independent risk factors for mild cognitive impairment in elderly people / F. Wang. M. Zhao. Z. Han [et al.] // J Exp Med. 2017. Vol.242, №2. P.121-128.
- 203. Wang, K. Vinpocetine attenuates neointimal hyperplasia in diabetic rat carotid arteries after balloon injury / K. Wang, L. Wen, W. Peng, H. Li, J. Zhuang, Y. Lu [et al.] // PLoS One. − 2014. − Vol.9, №5. e96894.
- 204. Wenda, X. PKA-CREB-BDNF signaling regulated long lasting antidepressant activities of Yueju but not ketamine / X. Wenda, W. Wang, T. Gong, H. Zhang, W. Tao [et al.] // Sci Rep. 2016. Vol.6. Art. 26331.
- 205. Xu, W. L. Uncontrolled diabetes increases the risk of Alzheimer's disease: a population-based cohort study / W. L. Xu, E. von Strauss, C. X. Qiu, B. Winblad, L. Fratiglioni // Diabetologia. 2009. Vol.52. P.1031–1039.
- 206. Xue, W. PKA-CREB-BDNF signaling regulated long lasting antidepressant activities of Yueju but not ketamine / W. Xue, W. Wang,

- T. Gong [et al.] // Sci Rep. 2016. Vol.6. P.26331.
- 207. Yang, J. L. Activation of GLP-1 Receptor Enhances Neuronal Base Excision Repair via PI3K-AKT-Induced Expression of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 / J. L. Yang, W. Y. Chen, Y. P. Chen [et al.] // Theranostics. 2016. Vol.6, №12. C.2015-2027.
- 208. Yun, S. I. Glycogen synthase kinase-3β regulates etoposide-induced apoptosis via Bcl-2 mediated caspase-3 activation in C3H10T1/2 cells / S. I. Yun, H. Y. Yoon, Y. S. Chung // Apoptosis. 2009. Vol.14, №6. P.771-7.
- 209. 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.
- Zhang, D. A. Type 2 diabetes with comorbid depression in relation to cognitive Iimpairment: an opportunity for prevention? / D. A. Zhang,
 V. Lam, V. Chu, M. Li // Mol Neurobiol. 2018. Vol.55, №1. P.85-89.
- 211. Zhang, X. Endothelial cell dysfunction and glycocalyx A vicious circle / X. Zhang, D.Sun, J. W. Song [et al.] // Matrix Biol. 2018. doi: 10.1016/j.matbio.2018.01.026.