

На правах рукописи

Бакулин Дмитрий Александрович

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

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

ВОЛГОГРАД – 2016

Работа выполнена на кафедре фармакологии и биофармации факультета усовершенствования врачей ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России

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

Официальные оппоненты: **Ковалев Георгий Иванович**
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий лабораторией
радиоизотопных методов исследований
«НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»

Рассохина Любовь Михайловна
доктор медицинских наук, доцент,
профессор кафедры фармакологии
«Южно-Уральского государственного
медицинского университета»

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва.

Защита состоится «___» февраля 2017 г. в _____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России (400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1 и на сайте www.volgmed.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

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

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

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

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

Выбор сахароснижающей терапии влияет не только на риск развития сердечно-сосудистых осложнений у пациента с СД 2 типа, но также может оказать влияние на тяжесть течения ишемического инсульта, поскольку на фоне базового лечения инсульта пациент продолжает получать гипогликемическую терапию. С этой позиции инкретиномиметики также привлекают внимание, поскольку по данным экспериментальных работ можно предполагать у них наличие нейропротекторного действия при ишемии головного мозга (ГМ) [Симаненкова А.В., 2014; Ma M., 2015; Gonçalves A., 2016].

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

Степень разработанности проблемы

По результатам клинических исследований у пациентов с СД 2 типа, инкретиномиметики выраженно уменьшали уровень гликозилированного

гемоглобина, а также умеренно снижали артериальное давление и массу жировой ткани [Аметов А.С., 2011; Мкртумян А.М., 2015; Сухарева О.Ю., 2012].

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

Средства с инкретиновой активностью способны ингибировать процессы апоптоза кардиомиоцитов [Аметов А.С., 2014а] и нейронов [Власов Т.Д., 2016] в условиях ишемии, а также улучшать функциональное состояние эндотелия при гипергликемии, посредством активации eNOS [Wei R., 2016], ингибирования экспрессии молекул адгезии [Krasner N.M., 2014] и процессов апоптоза [Zhan Y., 2012].

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

Цель исследования

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

Задачи исследования

1. Оценить выраженность церебропротекторного действия нового агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16 при его лечебно-профилактическом введении животным с ишемией головного мозга по влиянию на летальность, выраженность неврологического и когнитивного дефицита.
2. Проанализировать зависимость церебропротекторного действия исследуемого соединения от используемых доз при моделировании экспериментальной ишемии головного мозга на интактных животных.
3. Изучить влияние лечебно-профилактического введения агониста рецептора GPR119, соединения ZB-16 на размер инфаркта и степень отека головного мозга, выраженность неврологического, когнитивного дефицита и содержание продуктов перекисного окисления при моделировании фокальной ишемии головного мозга на фоне стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД.
4. Провести углубленное изучение возможных механизмов церебропротекторного действия агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16, оценив его гипогликемические свойства, влияние на секрецию инкретинов, а также вазодилатирующую функцию эндотелия, плазменный и тромбоцитарный

компонент гемостаза у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД и при фокальной ишемии головного мозга в условиях стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД.

Научная новизна исследования

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

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

Научно-практическая ценность и реализация результатов работы

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

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

Методология исследования

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

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

Положения, выносимые на защиту

1. Соединение ZB-16 оказывает церебропротекторное действие при экспериментальной ишемии головного мозга на фоне сахарного диабета, снижая размер инфаркта и степень отека головного мозга, выраженность

психоневрологического дефицита, содержание продуктов перекисного окисления липидов и улучшая вазодилатирующую и антитромботическую функцию эндотелия.

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

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

Личный вклад автора

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

Степень достоверности и апробации результатов

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

Объем и структура диссертации.

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе приведены данные отечественных и зарубежных исследований нейропротекторных свойств гипогликемических средств с инкретиновой активностью в условиях нарушения мозгового кровообращения

(НМК) и нейродегенеративных процессов, а также исследований эндотелиопротекторных свойств инкретиномиметиков при сахарном диабете [Кайдашев И.П., 2012; Спасов А.А., 2015; Tate M., 2015].

В экспериментальных исследованиях введение агонистов рецепторов ГПП-1 и ингибиторов ДПП-4 приводило к уменьшению размера некроза при моделировании ишемии ГМ [Симаненкова А.В., 2014; Green J.B., 2015]. В клинических исследованиях применение ряда агонистов рецепторов ГПП-1 приводило к снижению количества пациентов, погибших от сердечно-сосудистых осложнений СД, а также пациентов с нефатальным инфарктом миокарда или инсультом в опытной группе [Marso S.P., 2016; Ratner R., 2011].

Рецепторы к ГПП-1 экспрессируются на нейронах, клетках микроглии, эндотелиоцитах и способны запускать важнейшие сигнальные каскады, регулирующие функционирование клеток-мишеней. Механизм нейропротекторного действия средств с инкретиновой активностью связывают с ингибированием апоптоза нейронов, снижением активации микроглии и выделения провоспалительных цитокинов, а также с улучшением функционального состояния эндотелия в условиях гипергликемии, что может приводить к снижению выраженности эндотелиальной дисфункции и прокоагулянтного потенциала крови [Аметов А.С., 2014; Власов Т.Д., 2016].

Активация рецептора GPR119 представляет собой новый подход к воздействию на систему инкретинов, который заключается в повышении их секреции. В настоящее время идет активная разработка агонистов рецептора GPR119 в качестве препаратов для лечения СД 2 типа [Тюренов И.Н., 2015; Ritter K., 2016], при котором, как известно, значительно повышен риск развития инсульта. В связи с чем представляет интерес оценка влияния агонистов рецептора GPR119 на течение ишемии ГМ на фоне сахарного диабета.

Вторая глава диссертации посвящена описанию материалов и методов исследования, которое было выполнено в 3 этапа.

На первом этапе было изучено церебропротекторное действие агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16 на крысах линии Wistar в условиях экспериментальной ишемии ГМ с выбором наиболее активной дозы. В течение 3-х дней регистрировалось количество погибших животных, а также динамика и выраженность психоневрологического дефицита у выживших.

На втором этапе была произведена оценка влияния курсового (4 нед.) введения соединения ZB-16 животным со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД на течение фокальной ишемии ГМ. В течение 2-х дней у выживших животных оценивалась выраженность психоневрологического дефицита, размер инфаркта и степень отека ГМ, содержание ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) в крови и кислотная резистентность эритроцитов.

Исследуемое соединение разрабатывается как сахароснижающий препарат для лечения СД 2 типа. Поэтому на этапе изучения механизмов церебропротекторного действия мы оценили гипогликемическую активность соединения ZB-16 при курсовом введении в разных дозах на модели стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД, а также его влияние на секрецию ГПП-1 и инсулина у животных с диабетом и интактных крысах.

Дополнительно, после курсового введения ZB-16 у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД (4 нед.), а также у крыс со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД (4 нед.) и фокальной ишемией ГМ (2 суток после ОСМА) оценивались параметры плазменного, тромбоцитарного звеньев гемостаза и функциональное состояние эндотелия.

Исследование было выполнено на 354 крысах-самцах линии Wistar, возраст – 7-8 месяцев, масса – 330-360 г. (ФГУП «Питомник лабораторных животных «РАППОЛОВО», Ленинградская обл., Россия). Содержание и уход за животными осуществлялся согласно ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и Международным рекомендациям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986). Экспериментальная часть работы выполнена в соответствии с заключением Регионального Независимого Этического Комитета (ГБУ «Волгоградский Медицинский Научный Центр»): протокол № 191-2014 от 25 февраля 2014.

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-16¹ (дипиарон) (Рис. 1) было синтезировано в АО «ИИХР» (г. Химки, РФ) и представляет собой высокоселективный агонист рецептора GPR119 (EC₅₀=7,25 нМ) [Chafeev M.A., 2015]. По литературным данным большинство агонистов рецептора GPR119 проявляют выраженную активность *in vivo* в диапазоне доз от 1 до 25 мг/кг (*per os*) [Ritter K., 2016]. По предварительным исследованиям ZB-16 в дозе 1 мг/кг проявляет выраженную гипогликемическую активность, которая очевидно реализуется за счет стимуляции секреции инкретинов. Для исследования церебропротекторного потенциала соединения ZB-16 были выбраны дозы 1, 10 и 25 мг/кг (*per os*).

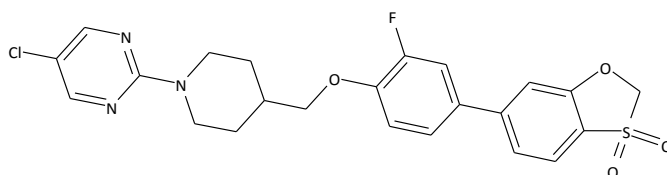


Рис. 1. Химическая структура агониста GPR119 – соединения ZB-16.

В качестве препаратов сравнения использовались метформин (400 мг/кг), глосглиптин (5 мг/кг) и цитиколин (500 мг/кг). Данные препараты вводились *per os* в наиболее активных, по литературным данным, дозах [Парфенов В.А., 2009; Ismail T.A., 2015; Sharma R., 2012].

Первым препаратом сравнения был выбран метформин, так как он является препаратом первой линии для лечения СД 2 типа.

Второй препарат сравнения выбран из группы ингибиторов ДПП-4, поскольку они, замедляя разрушение инкретинов, повышают их плазменную концентрацию, как и агонисты GPR119, которые стимулируют секрецию

¹ Выражаем глубокую благодарность начальнику отдела медицинской химии Шадееву Михаилу Айратовичу и всем сотрудникам АО «Исследовательского Института Химического Разнообразия» за предоставление субстанции вещества для данной работы.

эндогенных ГПП-1 и ГИП. В качестве второго препарата сравнения был выбран госоглиптин (АО «ИИХР», г. Химки, РФ), который по активности и фармакокинетическим параметрам превосходит большинство применяемых в настоящее время ингибиторов ДПП-4 ($IC_{50}=11,3$ нМ, T_{max} 0,5-1,5 ч, $T_{1/2}$ 15-27 ч, ингибирование ДПП-4 $>80\%$ в течение 24 ч сопровождается двукратным подъемом ГПП-1) [Недосугова Л.В., 2014].

Третьим препаратом сравнения выбран нейропротектор цитиколин (Ferrer Internacional, Испания), который широко используется во всем мире для вторичной нейропротекции при НМК различного генеза. Цитиколин вводили через 3 часа после моделирования ишемии ГМ и далее ежедневно 1 раз в сутки.

В качестве модели ишемического повреждения ГМ у интактных животных использовалась одномоментная билатеральная окклюзия общих сонных артерий (ООСА) [Тюренков И.Н., 2013; Farkas E., 2007], а у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД моделировалась фокальная ишемия ГМ посредством временной (30 минут) внутрисосудистой окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) по методу J. Koizumi (1986) [Мирзоян Р.С., 2012; Спасов А.А., 2014; Тюренков И.Н., 2014]. Наблюдение за животными после операции продолжалось в течение 3-х (после ООСА) и 2-х суток (после ОСМА). В качестве наркоза использовался хлоралгидрат в дозе 400 мг/кг.

После моделирования НМК в тесте «Ротарод» регистрировались нарушения координации: фиксировалось время удержания на вращающемся стержне за 3 попытки [Bohlen M., 2009].

Уровень неврологического дефицита после ООСА оценивался по шкале McGrow в модификации И. В. Ганнушкиной [Ганнушкина И.В., 1996], а после моделирования фокальной ишемии по шкале Garcia и шкале «Combs и D'Alecy» [Дайнеко А.С., 2014; Combs D.J., 1987].

После моделирования ишемии ГМ в последний день наблюдения в установке «Открытое поле» оценивалась двигательная (количество пересеченных квадратов) и ориентировочно-исследовательская активность (сумма стоек и актов обследования отверстий-норок). В тесте «Условная реакция пассивного избегания» (УРПИ) и тесте «экстраполяционного избавления» (ТЭИ) оценивалось сохранение памятного следа: фиксировались соответственно латентный период (ЛП) захода в темный отсек и ЛП подныривания (до моделирования НМК было проведено обучение и воспроизведение навыка в данных тестах) [Воронина Т.А., 2012; Островская, Р.У., 2012].

У животных с фокальной ишемией ГМ объем инфаркта и степень отёка пораженной гемисферы оценивались посредством анализа цифровых фотографий окрашенных (1% р-р 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида) срезов ГМ с использованием программного обеспечения (ПО) ImageJ 1.37 (Rasband W.S., США) [Brait V.H., 2010].

В качестве модели сахарного диабета использовался стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный СД, который вызывали путем однократного внутривентрального введения стрептозотоцина (65 мг/кг, Sigma-Aldrich, США) через 15 минут после предварительного введения никотинамида (230 мг/кг) [Спасов А.А., 2011; Masiello P., 1998].

Измерение уровня гликемии проводили после пищевой депривации (6 ч), кровь забирали из хвостовой вены. Концентрацию глюкозы в плазме крови определяли глюкозооксидазным методом [Камышников В.С., 2009] с использованием наборов «Глюкоза ФКД» (Россия) и спектрофотометра ПЭ-5400В (ЗАО «НПО Экрос», Россия). Пероральный тест на толерантность к глюкозе (ПТТГ) проводили путем однократного введения глюкозы (3 г/кг, per os) с предварительным и последующим определением уровня гликемии спустя 30, 60 и 120 мин [Спасов А.А., 2012]. С использованием ПО Prism 6 (GraphPad Software, США) рассчитывали площадь под кривой «уровень гликемии-время».

Количественное определение инсулина и ГПП-1 в сыворотке определяли методом ИФА с использованием тест-систем соответственно «Mercodia Rat Insulin ELISA» (Mercodia AB, Швеция) и «Rat glucagon-like peptide-1 ELISA Kit» (Cusabio, Китай) в соответствии с рекомендациями изготовителя, а также фотометра-анализатора SUNRISE («TECAN», Австрия), микропланшетного вошера HydroFlex M8/2 («TECAN», Австрия) и термошейкера для планшетов PST-60HL (BioSan, Латвия). Для работы с калибровочными кривыми использовалось ПО CurveExpert 1.3 (Daniel Hyams, США).

Концентрацию ТБК-активных продуктов в плазме определяли по образованию окрашенного комплекса при взаимодействии продуктов перекисного окисления липидов с тиобарбитуровой кислотой [Mihara M., 1978], с использованием стандартного набора фирмы Агат-Мед (Россия) и спектрофотометра ПЭ-5400В (ЗАО «НПО Экрос», Россия).

Кислотную резистентность эритроцитов оценивали по продолжительности гемолиза при добавлении соляной кислоты (0,004 н) к взвеси эритроцитов [Чернецкий Г.А., 2002] с использованием спектрофотометра ПЭ-5400В.

Тромбиновое время (ТВ), протромбиновое время (ПВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и содержание фибриногена в плазме были определены с использованием анализатора АПГ2-01 «МИНИЛАБ 701» ("Юнимед", Россия) и наборов реактивов производства НПО «Ренам» (Россия) [Баркаган З.С., 2001]. Кровь забирали из брюшной аорты. Исследование тромбоцитарного компонента гемостаза производили с использованием лазерного анализатора агрегации тромбоцитов (Биола 220 LA, Россия) по методу Born G. [Born G.V., 1962] в модификации Габбасова З.А. [Габбасов З.А., 1989].

Вазодилатирующую функцию эндотелия оценивали по относительному изменению скорости мозгового кровотока (МК) при внутривенном введении модификаторов синтеза NO: ацетилхолин (Acros organics, США) в дозе 0,01 мг/кг, нитро-L-аргинин (N-L-arg) (Acros organics, США) в дозе 10 мг/кг и нитроглицерин (МТХ, Москва) в дозе 0,007 мг/кг [Тюренков И.Н., 2008]. Регистрация уровня МК осуществлялась в бассейне среднемозговой артерии с помощью полиграфа MP150, модуля для лазерной доплеровской флоуметрии LDF100C и ПО AcqKnowledge 4.2 (Biopac Systems, США).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, США) и Prism 6 (GraphPad Software Inc., США). Для проверки распределения на нормальность использовали критерий Шапиро-Уилка. В зависимости от характера данных

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

В третьей главе представлены результаты изучения церебропротекторной активности соединения ZB-16 (в дозах 1, 10 и 25 мг/кг, per os) при лечебно-профилактическом введении в условиях ишемии ГМ, вызванной необратимой окклюзией общих сонных артерий (ООСА) у интактных животных.

Перевязка сонных артерий вызвала гибель большинства животных контрольной группы (60%) и 50% животных, которые получали исследуемое соединение в дозе 1 мг/кг (Таблица 1). Увеличение дозы соединения ZB-16 до 10 и 25 мг/кг приводило к снижению количества погибших животных по сравнению с контрольной группой (на 33%), что было сопоставимо с таковым в группе, получавшей цитиколин (25%) ($p < 0,05$).

Таблица 1. Летальность животных после перевязки общих сонных артерий.

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

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

При оценке выраженности неврологического дефицита по шкале McGraw было отмечено, что в контрольной группе (ООСА+физ.р-р) средний балл по шкале McGraw был высоким, что обусловлено большей гибелью животных и наличием у выживших таких симптомов, как двусторонний птоз, слабость конечностей, манежность движений и состояние комы.

В группе, получавшей соединение ZB-16 в дозе 1 мг/кг наблюдалась тенденция к снижению среднего балла неврологического дефицита по сравнению с контрольной группой (Рис. 2).

В группах, получавших соединение ZB-16 в дозе 10 и 25 мг/кг, через 2 и 3 дня после моделирования ООСА наблюдалось значимое снижение среднего балла по шкале McGraw относительно контрольной группы, сопоставимое с таковым в группе «ООСА+Цитиколин» (Рис. 2), что было обусловлено снижением количества и/или выраженности неврологических симптомов.

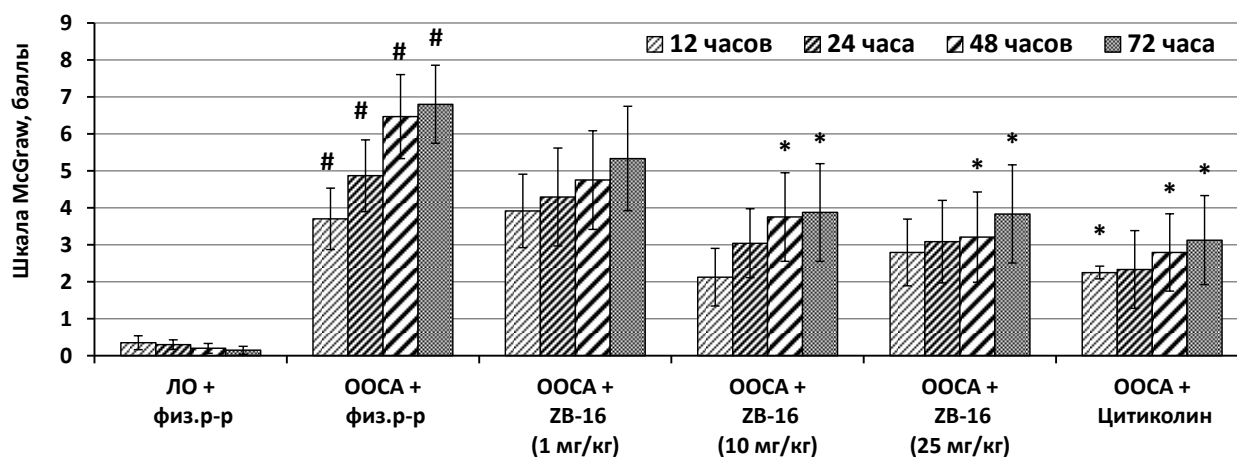


Рис. 2. Уровень неврологического дефицита в баллах по шкале McGraw.

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

В тесте «Ротарод» у животных, получавших соединение ZB-16 в разных дозах с первых к третьим суткам наблюдалось восстановление нарушенной координации. Средние показатели времени удержания на вращающемся стержне в группах, получавших ZB-16 в дозах 10 и 25 мг/кг значительно превосходили соответствующие показатели в контрольной группе и незначительно уступали показателям в группе животных, получавших цитиколин (Рис. 3).

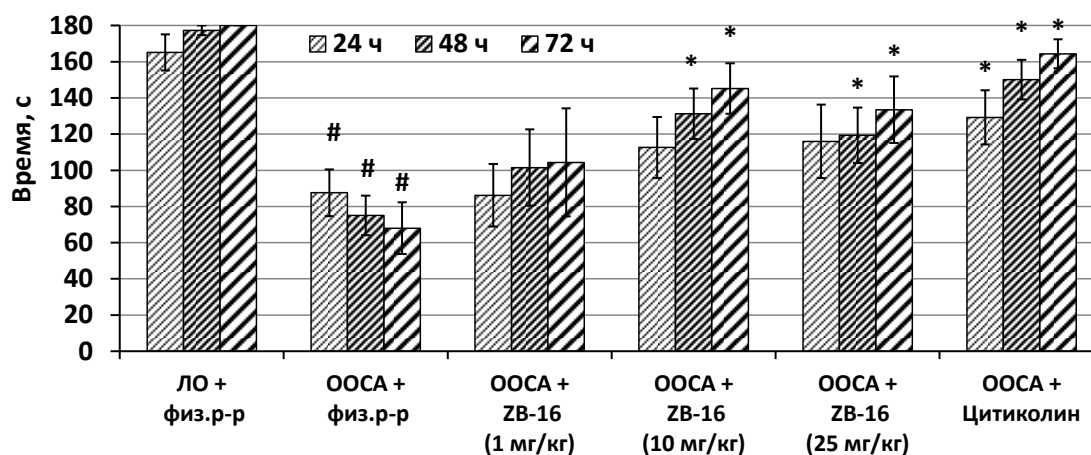


Рис. 3. Время удержания на вращающемся стержне в тесте «Ротарод».

Обозначения: как на рис.2.

В тесте «Открытое поле» у животных, не получавших лечения, двигательная и ориентировочно-исследовательская активность по сравнению с интактной группой была ниже на 51% и 71% соответственно (Рис. 4).

В группе, получавшей соединение ZB-16 в дозе 1 мг/кг, по сравнению с контрольной, наблюдалась тенденция к повышению ориентировочно-исследовательской активности.

На фоне введения исследуемого соединения в дозах 10 и 25 мг/кг через 72 часа после моделирования НМК показатель ориентировочно-исследовательской активности в соответствующих группах более, чем в 2 раза превысил таковой в группе без лечения (Рис. 4).

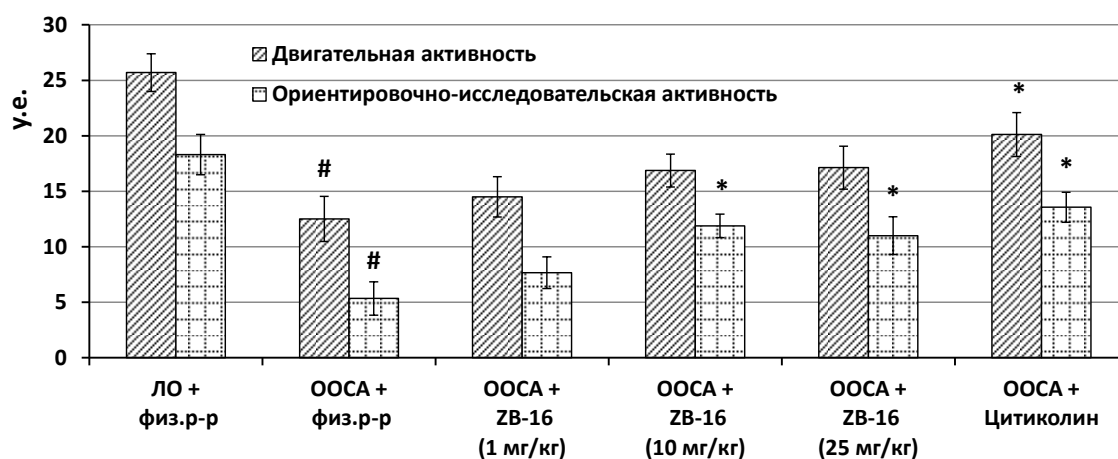


Рис. 4. Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных в тесте «Открытое поле».

Обозначения: как на рис.2.

При оценке сохранения памятного следа в тестах ТЭИ и УРПИ было отмечено, что спустя 72 часа после операции в контрольной группе животные чаще и быстрее заходили в темный отсек (УРПИ), а также значимо дольше по времени решали задачу экстраполяционного избавления (ТЭИ) (Рис. 5).

В группах, животным которых вводили соединение ZB-16 в дозах 1, 10 и 25 мг/кг, а также препарат сравнения цитиколин, в тесте УРПИ наблюдалось значимое повышение ЛП захода в темный отсек (Рис. 5), по сравнению с контрольной группой.

В тесте ТЭИ значимое снижение ЛП подныривания наблюдалось в группе, получавшей цитиколин, в то время как, в группах, получавших соединение ZB-16 во всех дозах наблюдалась сопоставимая тенденция к снижению времени решения экстраполяционной задачи (Рис. 5).

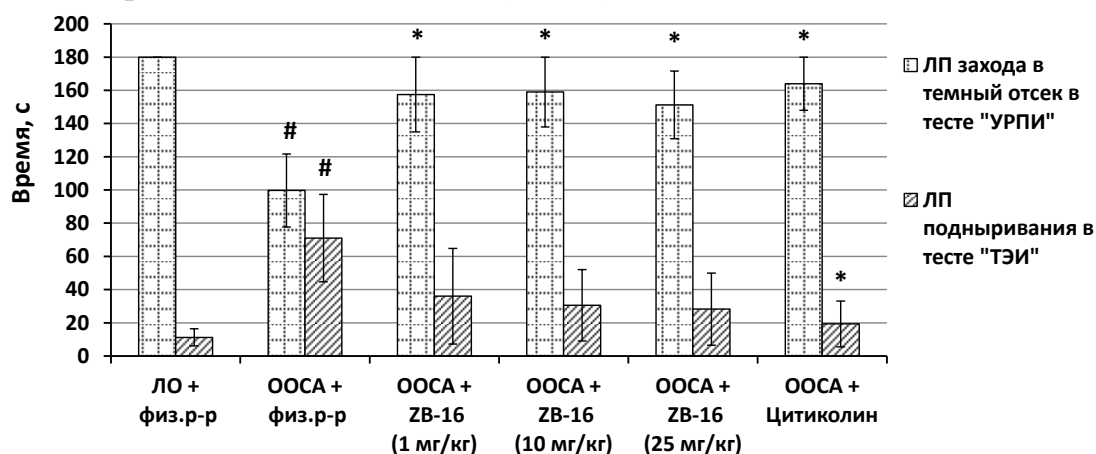


Рис. 5. Латентный период захода в темный отсек в тесте УРПИ и латентный период подныривания в тесте ТЭИ.

Обозначения: как на рис.2.

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

Агонисты рецептора GPR119 разрабатываются в качестве пероральных гипогликемических препаратов для длительного применения у пациентов с СД 2 типа. По этой причине является целесообразным изучение влияния агонистов GPR119 на течение ишемического инсульта в условиях экспериментального СД.

На следующем этапе исследования нами была проведена оценка церебропротекторного действия соединения ZB-16 у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД при 4-х недельном введении с последующим моделированием фокальной ишемии ГМ.

В четвертой главе изложены результаты изучения влияния лечебно-профилактического введения агониста рецептора GPR119 и препаратов сравнения на течение ишемического процесса при окклюзии средней мозговой артерии на фоне стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД (n=13).

По результатам предварительного исследования соединение ZB-16 проявляет максимально выраженную гипогликемическую активность в дозе 1 мг/кг. Поэтому животным с экспериментальным СД в течение 4-х недель исследуемое соединение вводили в дозе 1 мг/кг, а после моделирования ОСМА дозу увеличивали до 10 мг/кг 1 раз в сутки.

У животных, получавших соединение ZB-16, уровень неврологического дефицита по шкале Garcia (через 24 и 48 часов) был значимо ниже по сравнению с животными в контрольной группе, что проявлялось в снижении выраженности асимметрии движений конечностей и реакций на прикосновение (Рис. 6).

В группах, получавших гипогликемические препараты метформин и глосглиптин наблюдалось значимое снижение неврологического дефицита по шкале Garcia только на второй день наблюдения (Рис. 6).

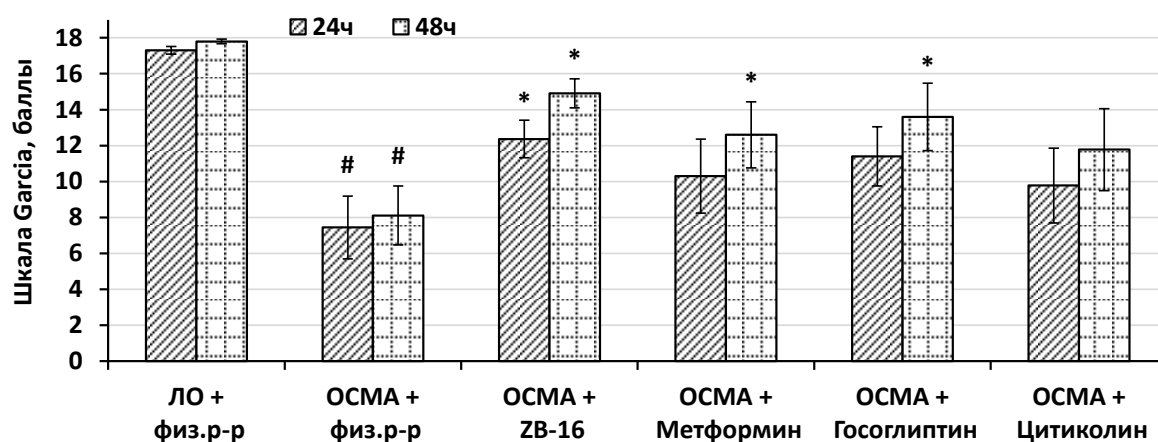


Рис. 6. Уровень неврологического дефицита в баллах по шкале Garcia.

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

При оценке уровня неврологического дефицита по шкале Combs и D'Alecy у животных контрольной группы отмечалось снижение мышечной силы конечностей и неспособность сохранять равновесие на неподвижном стержне.

В группах, получавших соединение ZB-16 и госоглиптин, через 48 часов после моделирования ОСМА, уровень неврологического дефицита по шкале Combs и D'Alecy был значимо меньше, чем в контрольной (Рис. 7).

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

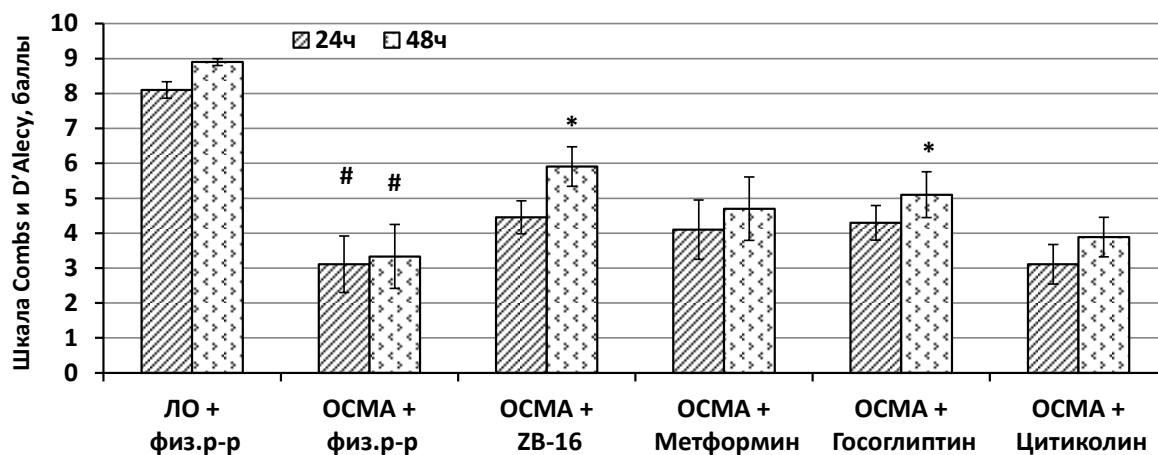


Рис. 7. Уровень неврологического дефицита по шкале Combs и D'Alecy.

Обозначения: как на рис. 6.

При проведении теста «Ротарод» было отмечено, что у животных в группе, получавшей соединение ZB-16 (через 24 и 48 часов после моделирования НМК) наблюдались менее выраженные нарушения силы и координации, что выражалось в значимом, по сравнению с контрольной группой, увеличении времени удержания на вращающемся стержне за 3 попытки (Рис. 8).

В группах, получавших метформин и госоглиптин среднее время удержания на вращающемся стержне было значимо выше, чем в контрольной группе только через 48 часов после моделирования НМК и уступало таковому в группе «ОСМА+ZB-16» (Рис. 8).

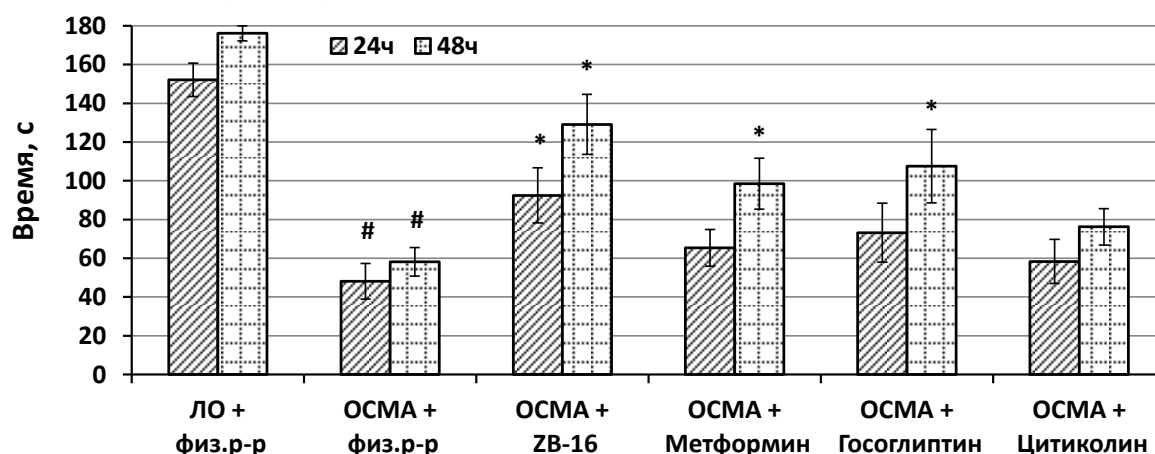


Рис. 8. Время удержания на вращающемся стержне в тесте «Ротарод».

Обозначения: как на рис. 6.

Через 48 часов после ОСМА в тесте «Открытое поле» у животных оценивалась двигательная и ориентировочно-исследовательская активность (Рис. 10), фиксировался трекинг их передвижений (Рис. 9).

В контрольной группе спустя 48 часов после моделирования ОСМА наблюдалось значительное снижение двигательной и ориентировочно-исследовательской активности (Рис. 10). Животные двигались на небольшом участке с редкими заглядываниями в норки и редкими стойками (Рис. 9).

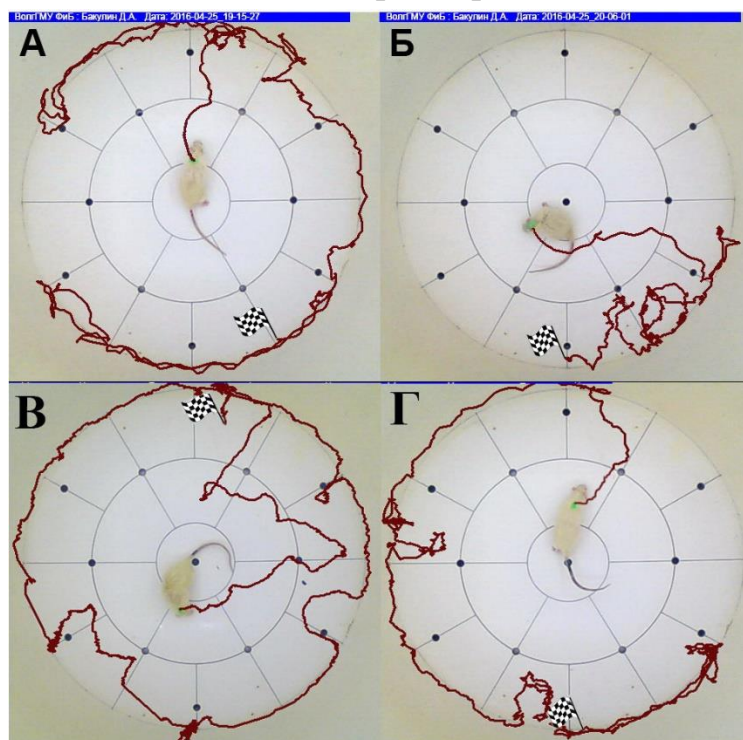


Рис. 9. Характерная траектория движения в тесте Открытое поле для групп «ЛО+физ.р-р» (А), «ОСМА+физ.р-р» (Б), «ОСМА+ZB-16» (В) и «ОСМА+Госоглиптин» (Г).

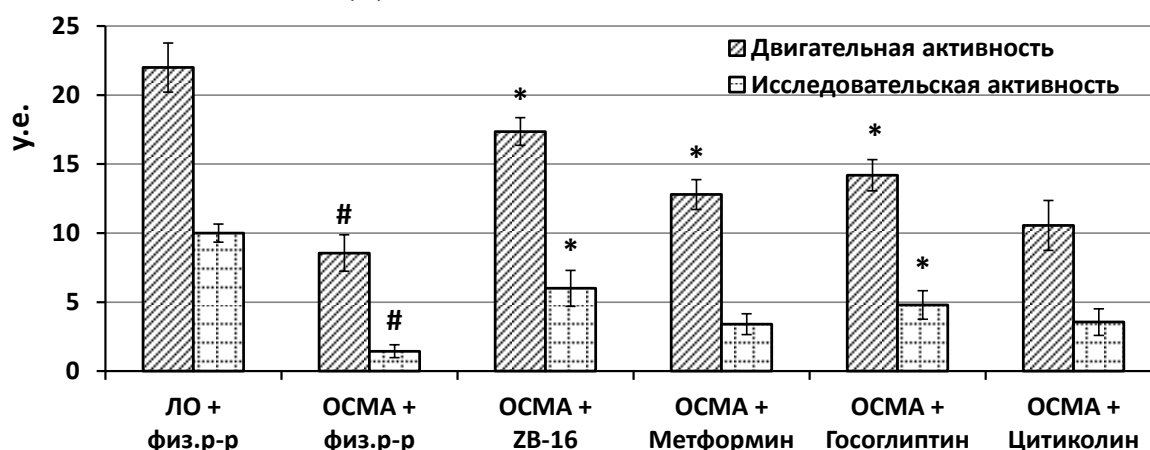


Рис. 10. Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных через 48 часов после моделирования с фокальной ишемии ГМ на фоне сахарного диабета.

Обозначения: как на рис.6.

В группах, получавших соединение ZB-16 и госоглиптин наблюдались значимо большие, по сравнению с контрольной группой показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности (Рис. 10). Животные данных групп более полно обследовали пространство установки (Рис. 9), исследовали норки и часто выполняли стойки. В группе

«ОСМА+Метформин» наблюдалось значимое повышение только двигательной активности, по сравнению с контрольной группой (Рис. 10).

В тесте «УРПИ» в группах, получавших курсом соединение ZB-16, а также гипогликемические препараты, наблюдалось значимое сопоставимое повышение латентного периода захода в темный отсек в тесте УРПИ (Рис. 11).

В «ТЭИ» значимое сопоставимое снижение латентного периода подныривания наблюдалось в группах, получавших соединение ZB-16 и гогоглиптин (Рис. 11).

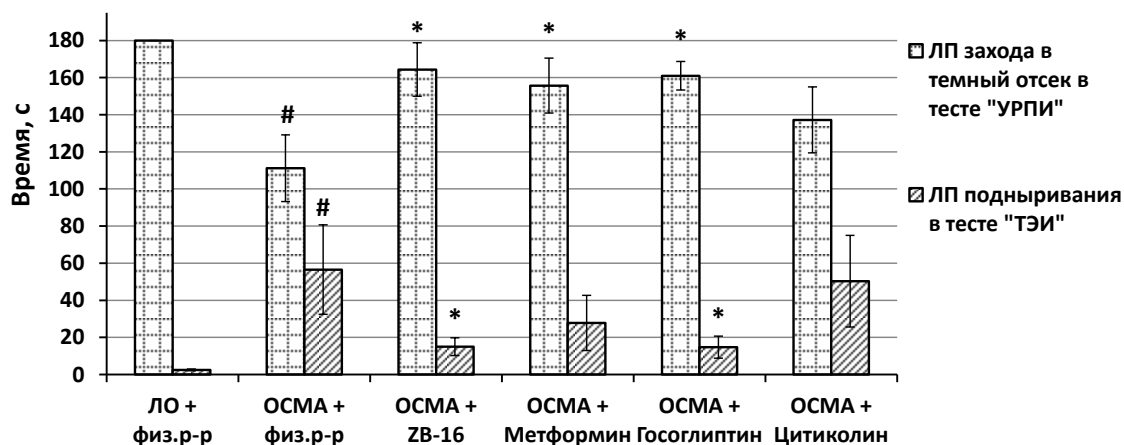


Рис. 11. Латентный период захода в темный отсек в тесте УРПИ и латентный период подныривания в тесте ТЭИ.

Обозначения: как на рис. 6.

В группе животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, получавших в течение 4-х недель агонист GPR119, соединение ZB-16 объем некроза, рассчитанный относительно объема пораженной гемисферы был равен $19,0 \pm 3,9\%$, что было на 43% меньше, чем в контрольной группе без лечения (Рис. 12, Рис. 13). При этом относительное увеличение объема пораженной гемисферы, которое характеризует степень отека, в группе, получавшей ZB-16, было на 46% ниже, чем в контрольной группе (Рис. 13).

В группе, получавшей в течение 4-х недель препарат сравнения гогоглиптин, относительный размер инфаркта и увеличение объема пораженной гемисферы были соответственно ниже на 37% и 40% по сравнению с контрольной группой (Рис. 12, Рис. 13)

В то же время в группе, получавшей в течение 4-х недель метформин наблюдалась тенденция к снижению относительного размера инфаркта и объема пораженной гемисферы, не достигающая статистической значимости по сравнению с контрольной группой (Рис. 12, Рис. 13)

При этом в группе животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД без гипогликемической терапии, но получавшей препарат цитиколин после ОСМА относительный размер инфаркта и объем пораженной гемисферы практически не отличались от таковых в контрольной группе (Рис. 12, Рис. 13).

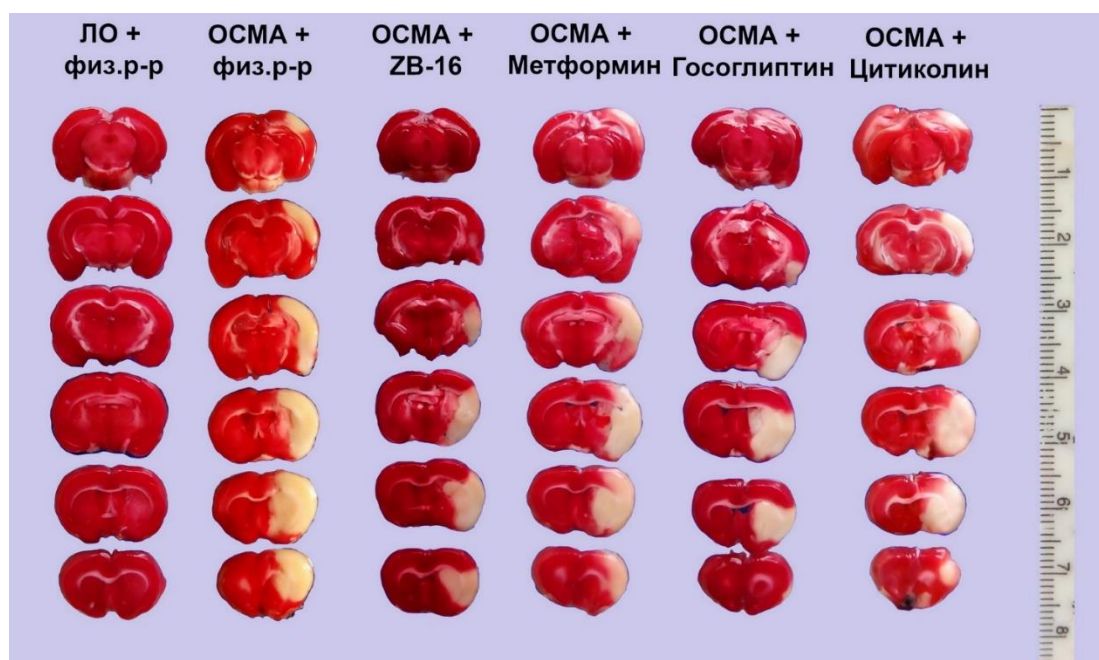


Рис. 12. Срезы головного мозга (толщина 2 мм, окраска: 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид 1%)

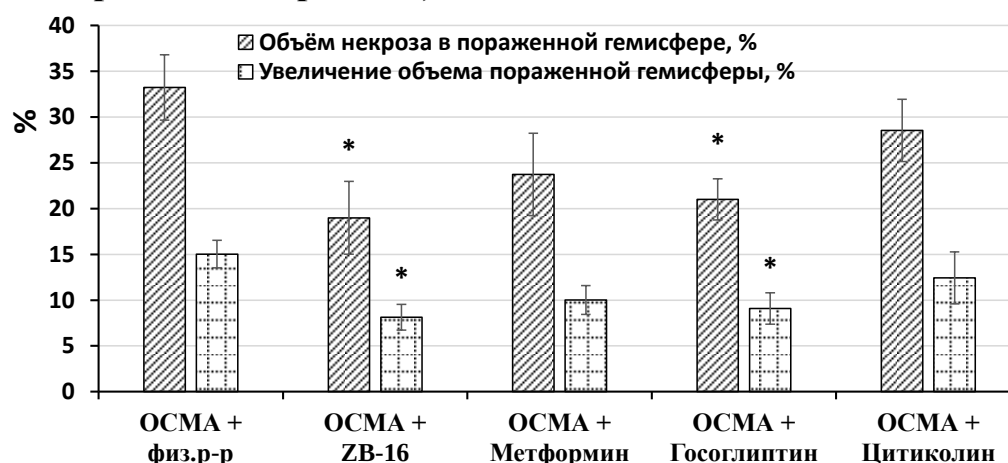


Рис. 13. Объем некроза и увеличение объема пораженной гемисферы у животных с ОСМА на фоне сахарного диабета.

Обозначения: как на рис.6.

У животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, получавших соединение ZB-16, метформин и госоглиптин содержание ТБК-активных продуктов в плазме крови и кислотная резистентность эритроцитов через 48 часов после моделирования ОСМА была значимо ниже по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, курсовое введение агониста GPR119 – соединения ZB-16 животным со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД способствует формированию меньшего размера некроза при моделировании ОСМА и меньшей выраженности неврологического, поведенческого и когнитивного дефицита по сравнению с группой, не получавшей гипогликемическую терапию, а также группой, получавшей метформин. Наблюдаемое церебропротекторное

действие соединения ZB-16 незначимо превосходило таковое у препарата сравнения глосоглиптин.

В пятой главе представлены результаты исследования некоторых свойств агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16, которые могут иметь значение в реализации церебропротекторного действия исследуемого соединения (n=12).

Была выполнена оценка гипогликемического действия соединения ZB-16, его влияние на секрецию ГПП-1 и инсулина, а также оценка влияния на функциональное состояние эндотелия и параметры гемостаза у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД (4 нед.), а также у крыс со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД (4 нед.) после моделирования фокальной ишемии ГМ.

У животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, которые получали соединение ZB-16 дозе 1 мг/кг в течение 4-х недель уровень гликемии через 30, 60 и 120 минут после перорального введения глюкозы был значимо ниже по сравнению с таковым в контрольной группе (Таблица 2). При этом, в данной группе, через 2 часа после глюкозной нагрузки уровень гликемии практически вернулся к исходному и превышал его на 4%, как и в группе, получавшей метформин (+3%).

Таблица 2. Показатели гликемии (ммоль/л) у крыс со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД при проведении перорального теста на толерантность к глюкозе на 28-е сутки после начала лечения.

Группа	Перед ПТТГ, 0 минут	Время после введения глюкозы per os		
		30 минут	60 минут	120 минут
Интакт + физ.р-р	3,7±0,2	5,0±0,2	4,9±0,2	3,8±0,1
СД + физ.р-р	9,6±0,5	21,6±1,1 [#]	16,5±0,3 [#]	11,0±0,6 [#]
СД + ZB-16 (0,1 мг/кг)	8,4±0,5	17,6±0,8	13,2±1,1 [*]	9,4±0,6
СД + ZB-16 (1 мг/кг)	7,9±0,4	15,7±0,9 [*]	13,1±0,8 [*]	8,2±0,1 [*]
СД + ZB-16 (10 мг/кг)	8,2±0,7	16,5±0,8 [*]	13,0±1,0 [*]	8,7±0,9 [*]
СД + Метформин	7,5±0,6	12,6±0,8 [*]	10,8±1,2 [*]	7,7±0,6 [*]
СД + Глосоглиптин	8,1±0,6	16,2±0,9 [*]	13,5±1,3 [*]	8,8±0,7 [*]

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

При расчете площади под кривой «уровень гликемии-время» (AUC_{0-120} , ммоль/л*мин) было отмечено, что уровень AUC_{0-120} во всех опытных группах был значимо ниже по сравнению с таковым в контрольной группе. При этом в группах, получавших ZB-16 в дозе 1 мг/кг и метформин, уровень AUC_{0-120} был ниже, чем в контрольной группа на 26 и 38% соответственно (Рис. 14).

Полученные данные указывают на улучшение толерантности к глюкозе в группе, получавшей ZB-16, выражающееся в меньшей величине пика роста гликемии и меньшем ее уровне через 2 часа после глюкозной нагрузки, что

может быть связано с увеличением продукции инкретинов и инсулина при введении агониста рецептора GPR119.

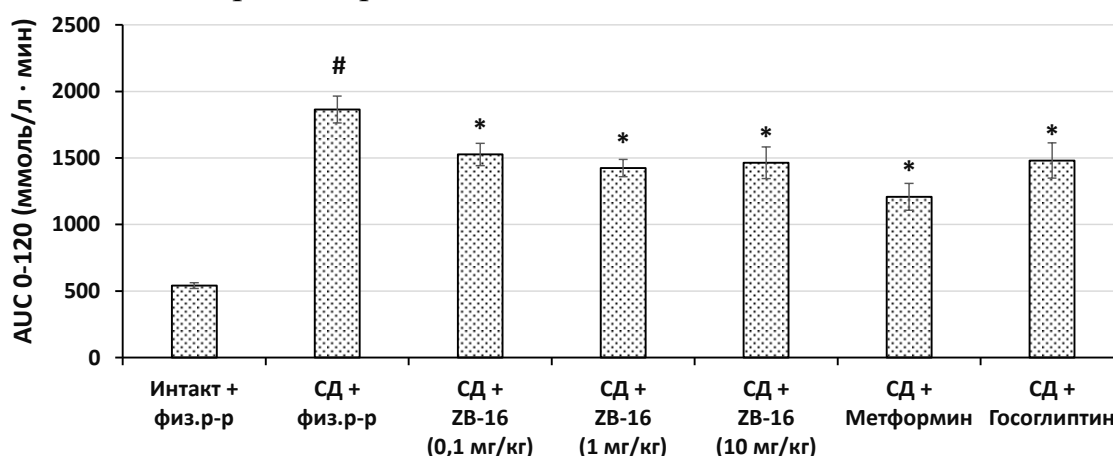


Рис. 14. Площадь под кривой «уровень гликемии-время» при проведении ПТТГ после 4х недель лечения.

Обозначения: как у Таблицы 2.

При исследовании влияния соединения ZB-16 в дозе 1 мг/кг на секрецию ГПП-1 и инсулина было выявлено, что введение агониста рецептора GPR119 значительно повышает уровень ГПП-1 до глюкозной нагрузки как в группе животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД после курсового введения (на 121%), так и у интактных после однократного введения (на 119%) (Рис. 15А).

До глюкозной нагрузки предварительное введение соединения ZB-16 вызвало незначительное повышение (на 11%) уровня инсулина у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, при этом у интактных животных уровень инсулина не изменился (Рис. 15Б).

Через 15 минут после перорального введения глюкозы в опытных группах, получавших курсом или однократно соединение ZB-16 уровень ГПП-1 и инсулина значимо превышал таковой в соответствующих контрольных группах. Уровень ГПП-1 у животных с СД, получавших ZB-16, превышал таковой в контрольной группе на 90%, а у интактных животных, получивших ZB-16, соответственно на 38% (Рис. 15А).

Через 15 минут после пероральной глюкозной нагрузки уровень инсулина у животных с СД, получавших ZB-16, был выше, чем в контрольной группе на 38%, а у интактных животных соответственно на 78% (Рис. 15Б).

Таким образом, в результате проведенного исследования было установлено, что соединение ZB-16 проявляет выраженную гипогликемическую активность уже в дозе 1 мг/кг, которая не увеличивается при повышении дозы до 10 мг/кг. При исследовании механизмов гипогликемического действия соединения ZB-16 было показано, что после введения соединения ZB-16 у животных с и без диабета наблюдается значительное повышение базального уровня ГПП-1 (более, чем в 2 раза), а при глюкозной нагрузке соединение ZB-16 значимо увеличивает выработку ГПП-1 и инсулина как у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, так и у интактных крыс (Рис. 15А и Б).

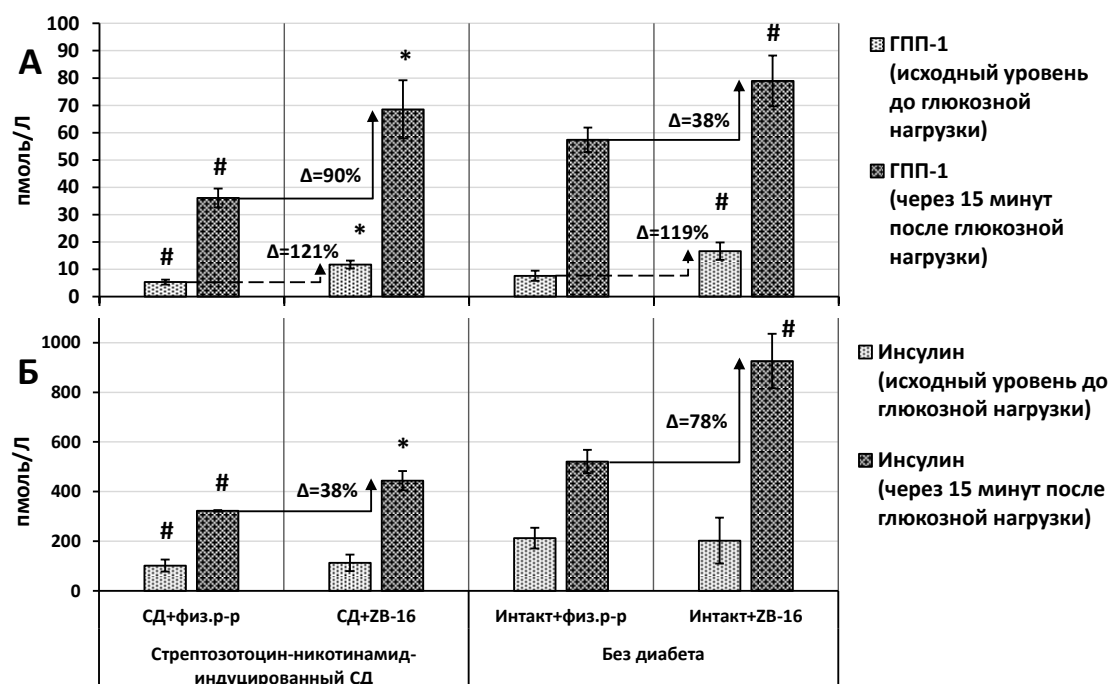


Рис. 15. Влияние агониста GPR119 на уровень ГПП-1 (А) и инсулина (Б) при глюкозной нагрузке у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД и животных без диабета (n=11).

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

При оценке функционального состояния эндотелия и параметров коагуляционного и тромбоцитарного гемостаза у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД было отмечено, что введение на протяжении 4-х недель соединения ZB-16, метформина и глосглиптина сопоставимо способствует улучшению функционального состояния эндотелия, нормализации АЧТВ, ПВ, ТВ и уровня фибриногена в плазме, а также степени и скорости агрегации тромбоцитов.

На заключительном этапе исследования, описанного в четвертой главе, через 2 суток после моделирования ОСМА, у животных также были исследованы функциональное состояние эндотелия и параметры коагуляционного и тромбоцитарного гемостаза.

В группе животных с фокальной ишемией ГМ на фоне стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД, получавших соединение ZB-16, введение ацетилхолина вызывало наибольший прирост уровня МК (+29%), при этом в группе, получавшей метформин прирост МК был незначительно меньше (+24%), как и в группе, получавшей глосглиптин (+25%) (Рис. 16).

При введении блокатора NO синтазы (нитро-L-аргинина) более выражено МК снижался в группе, получавшей агонист GPR119 (-32%), в группах, получавших препараты сравнения метформин и глосглиптин, снижение МК было незначительно менее выражено (на 27% и 30% соответственно), но превышало таковое в контрольной группе (Рис. 16).

Полученные данные свидетельствуют об улучшении функционального состояния эндотелия у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД и ишемией ГМ на фоне введения исследуемого соединения.

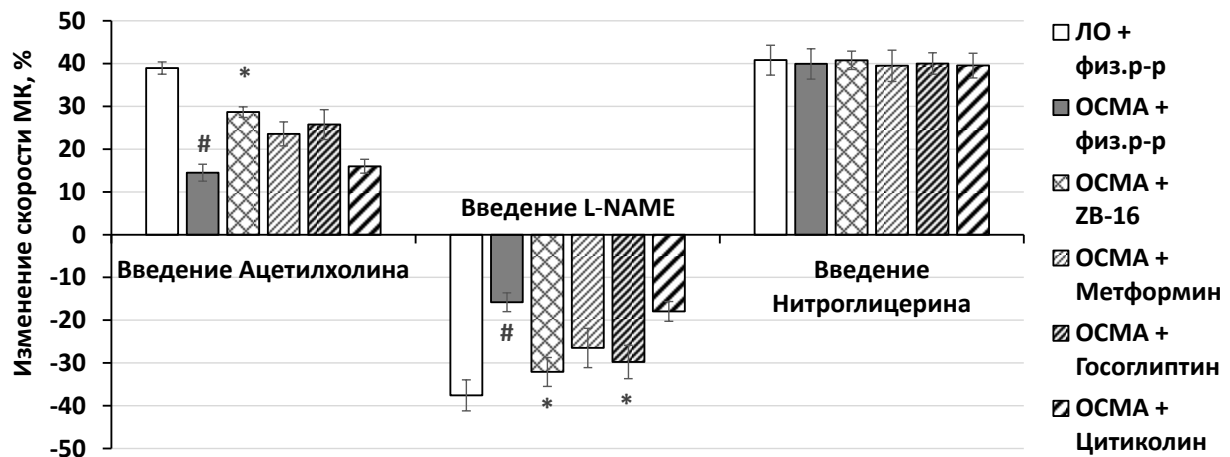


Рис. 16. Исследование функционального состояния эндотелия у животных с ишемией ГМ на фоне сахарного диабета.

Обозначения: как на рис.6.

У животных, получавших гипогликемическую терапию в течение 28 дней перед моделированием фокальной ишемии ГМ, наблюдаемые нарушения в коагуляционном гемостазе были менее выражены, особенно в группах, получавших агонист GPR119 и ингибитор ДПП-4 (Рис. 17).

В группе, получавшей метформин, на фоне ишемии ГМ наблюдалась тенденция к нормализации нарушений в коагуляционном гемостазе, не достигающая уровня статистической значимости (Рис. 17).

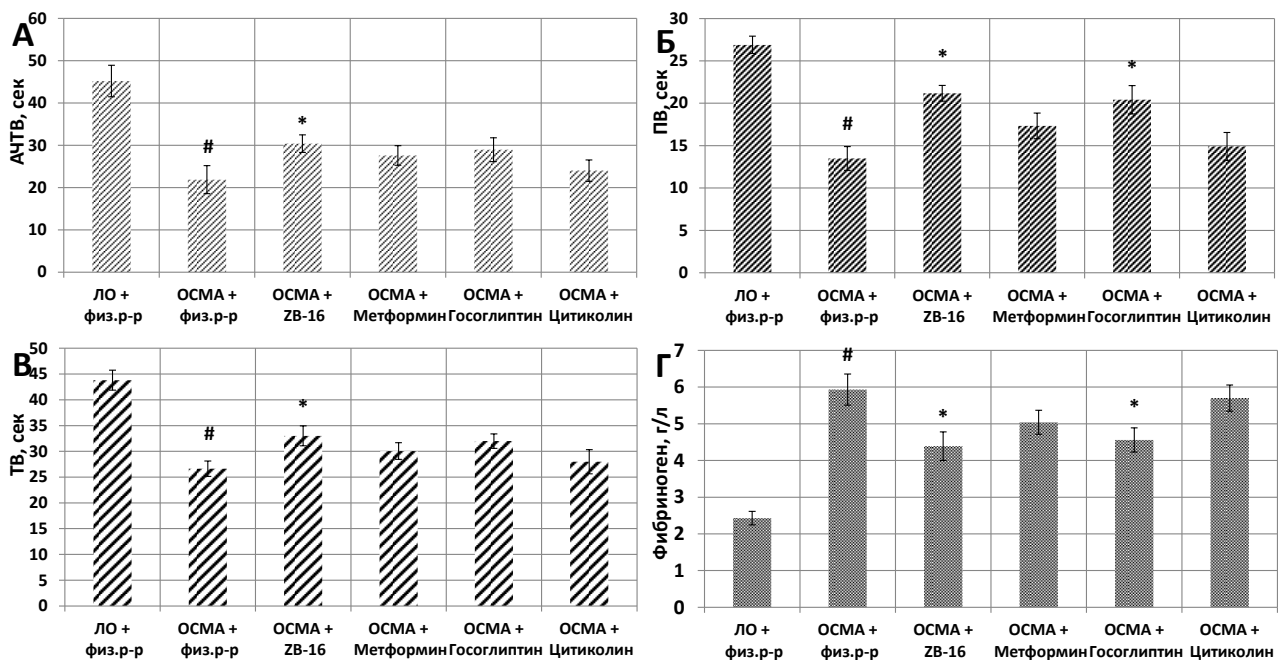


Рис. 17. Основные показатели коагуляционного гемостаза у животных с ишемией ГМ на фоне сахарного диабета: (А) АЧТВ, (Б) протромбиновое время, (В) тромбиновое время, (Г) уровень фибриногена.

Обозначения: как на рис.6.

В группе животных с фокальной ишемией ГМ на фоне экспериментального СД, получавшей соединение ZB-16 наблюдалось выраженное снижение степени и скорости агрегации тромбоцитов по сравнению с таковыми в контрольной группе (меньше на 21 и 26% соответственно) (Рис. 18).

В группе, получавшей метформин, наблюдалась тенденция к снижению степени и скорости агрегации тромбоцитов, а в группе, получавшей госоглиптин, значительно снизилась скорость агрегации тромбоцитов по сравнению с таковой в контрольной группе (Рис. 18)

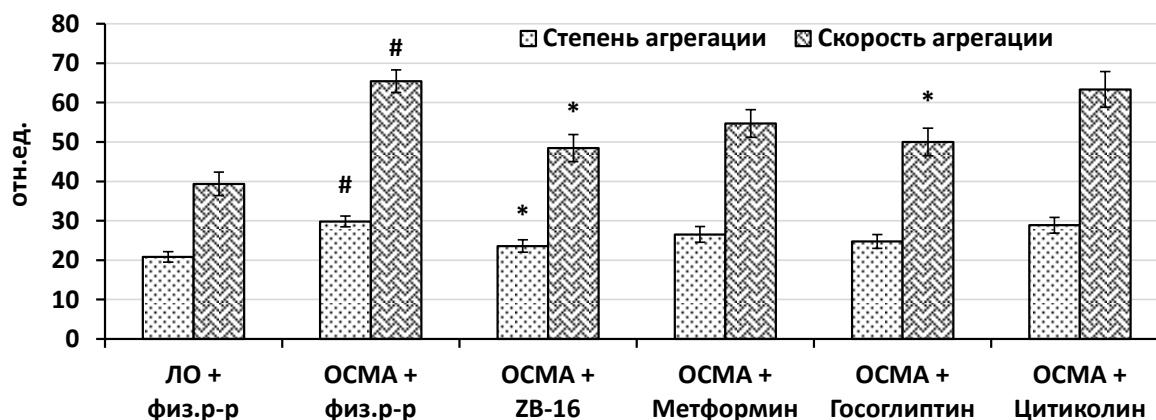


Рис. 18. Основные показатели тромбоцитарного гемостаза у животных с ишемией ГМ на фоне сахарного диабета: степень и скорость агрегации тромбоцитов.

Обозначения: как на рис.6.

Таким образом, соединение ZB-16 обладает выраженным гипогликемическим действием, которое реализуется посредством двукратного повышения секреции инкретиннов, а также повышения секреции инсулина при глюкозной нагрузке.

Исследуемое соединение в меньшей степени, чем метформин, снижало уровень гликемии, но сопоставимо способствовало сохранению вазодилатирующей функции эндотелия и нормализации параметров коагуляционного гемостаза в условиях экспериментального сахарного диабета.

При ишемическом повреждении ГМ на фоне экспериментального СД в группе, получавшей соединение ZB-16 наблюдалось значимое улучшение функционального состояния эндотелия по сравнению с контрольной группой, в то время, как в группе, получавшая метформин, наблюдалась тенденция к повышению эндотелийзависимой вазодилатации и нормализации параметров гемостаза.

В **Обсуждении** приводится обобщение полученных результатов исследования, их интерпретация с учетом литературных данных.

Делается **заключение** о том, что агонист рецептора GPR119 – соединение ZB-16 оказывает церебропротекторное действие у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД. Это вероятно обусловлено не только его инкретинопосредованной гипогликемической активностью (контролем гликемии у данных животных), но и инкретинопосредованным нейро- и эндотелиотропным действием соединения ZB-16.

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

Результаты представленного исследования указывают на необходимость дальнейшего изучения и более широкого использования средств с инкретиновой активностью при терапии СД 2 типа, которые помимо гипогликемического действия оказывают церебро- и эндотелиопротекторное действие, и могут снизить тяжесть течения ишемического инсульта у пациентов с СД 2 типа

ВЫВОДЫ

1. Лечебно-профилактическое введение агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16 при перевязке общих сонных артерий интактным животным уменьшает их гибель на 30% в сравнении с животными контрольной группы, а у выживших снижает выраженность неврологического (в среднем на 35-40%) и когнитивного дефицита по сравнению с группой без лечения.
2. Соединение ZB-16 в дозе 10 мг/кг оказывает наиболее выраженное церебропротекторное действие в условиях ишемии головного мозга, вызванной перевязкой общих сонных артерий у интактных животных, сопоставимое с таковым у цитиколина.
3. Агонист рецептора GPR119 – ZB-16 при лечебно-профилактическом 4-х недельном введении животным со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным сахарным диабетом и последующим моделированием ишемии ГМ, оказывает выраженное церебропротекторное действие, по сравнению с группой без лечения снижая размер инфаркта (на 43%), степень отека мозга (на 47%), неврологический (по шкале «Garcia» и «Combs и D'Alecy» в среднем на 74 и 61%) и когнитивный дефицит, содержание ТБК-активных продуктов в плазме (на 26%), а также улучшая вазодилатирующую и антитромботическую функцию эндотелия мозговых сосудов.
4. В условиях стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного сахарного диабета соединение ZB-16 оказывает выраженное гипогликемическое действие, при ПТТГ снижая площадь под кривой «уровень гликемии-время» (на 26%), повышая до и после глюкозной нагрузки секрецию ГПП-1 (на 121 и 90%) и инсулина (на 11 и 38%) по сравнению с контрольной группой без лечения.
5. Механизм церебропротекторного действия агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16 в условиях экспериментальной ишемии головного мозга на фоне сахарного диабета обусловлен инкретинопосредованным гипогликемическим, нейропротекторным и эндотелиотропным действием.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Выявленное церебропротекторное действие агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16 в условиях моделирования нарушений мозгового кровообращения при СД 2 свидетельствует о перспективности создания на его основе гипогликемического препарата для лечения больных с сахарным диабетом 2 типа и высоким риском ишемического поражения ГМ.
2. Целесообразно продолжить синтез и дальнейший поиск новых эффективных гипогликемических препаратов с церебропротекторным действием среди агонистов рецептора GPR119, стимулирующих секрецию инкретинов.
3. Включение в учебные пособия по фармакологии в разделы «средства терапии сахарного диабета 2 типа» результаты настоящей работы по экспериментальному изучению гипогликемической и церебропротекторной активности нового агониста рецептора GPR119 является целесообразным.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Бакулин Д.А., Куркин Д.В., Волотова Е.В., Шафеев М.А., Тюренков И.Н. Церебропротекторная активность разных доз агониста GPR119 – соединения ZB-16 при экспериментальной ишемии головного мозга // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6.; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25714> (дата обращения: 02.12.2016).
2. Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Волотова Е.В., Шафеев М.А. Сравнение гипогликемической активности нового агониста GPR119 и ингибитора ДПП-4 ситаглиптина // Проблемы эндокринологии. – 2016. – Т.62. – №1. – С. 38-43
3. Куркин Д.В., Волотова Е.В., Бакулин Д.А., Шафеев М.А., Тюренков И.Н. Влияние нового агониста рецептора GPR119 соединения ZB-16 на коагуляционный гемостаз крыс при экспериментальном сахарном диабете // Вестник ВолгГМУ. – 2016. – № 1(57). – С.48-51.
4. Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Бакулин Д.А., Волотова Е.В., Смирнов А.В., Медников Д.С., Шафеев М.А. Влияние нового агониста рецептора GPR119, соединения ZB-16 и ситаглиптина на уровень гликемии и инсулина, утилизацию глюкозы и структурные изменения в эндокринной части поджелудочной железы крыс при экспериментальном сахарном диабете 2-го типа // Проблемы Эндокринологии. – 2016. – Т.62, №4. – С. 32-37.
5. Тюренков И.Н., Бакулин Д.А., Куркин Д.В., Ломкина Е.М., Волотова Е.В. Агонисты GPR119 рецепторов: характеристика, физиологическая роль и перспективы использования в терапии сахарного диабета 2 и метаболического синдрома // Успехи физиологических наук. – 2015. – Т. 46, №4. – С.28-37.

Патенты на изобретение

1. Иващенко, А.В., Иващенко А.А., Кравченко Д.В., Шафеев М.А., Гезенвей Ю.А., Юдин М.А., Петров В.И., Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Волотова Е.В., Бакулин Д.А. Замещенные 4-{[4-(3,3-диоксидо-1,3-бензоксатиол-6-

ил)арилокси]метил}пиперидины как агонисты рецепторов GPR119, фармацевтическая композиция, способы их получения и применения // Патент РФ 2576037, опубликовано 27.02.2016

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций

1. **Бакулин Д.А., Куркин Д.В.** Изучение гипогликемической активности нового агониста GPR119 рецептора на интактных животных // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: материалы 72-ой открытой научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием. – Волгоград. – 2014. – С.220.
2. **Бакулин Д.А., Краснощекова Д.А.** Влияние нового агониста рецептора GPR119 на толерантность к глюкозе интактных животных // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: материалы 73-ой открытой научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием. – Волгоград. – 2015. – С.314-315.

Работы, поданные в печать

1. **Бакулин Д.А.** Оклюзия средней мозговой артерии у крыс линии Wistar с экспериментальным сахарным диабетом: выбор оптимальной продолжительности ишемии // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – №11 (часть 6) (Принято к печати).
2. **Бакулин Д.А.** Церебропротективный потенциал агониста рецептора GPR119 при ишемии головного мозга // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: материалы 74-ой открытой научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием. – Волгоград. – 2016. (Принято к печати).
2. **Тюренок И.Н., Бакулин Д.А., Куркин Д.В., Волотова Е.В.** Нейропротективные свойства инкретиномиметиков при ишемии головного мозга и нейродегенеративных заболеваниях // Проблемы эндокринологии. (Принято к печати).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЧТВ – активированное частично тромбопластиновое время	ПВ – протромбиновое время
ГИП – глюкозозависимый инсулинопотропный полипептид	ПО – программное обеспечение
ГМ – головной мозг	ПТТГ – пероральный тест на толерантность к глюкозе
ГПП-1 – глюкагоноподобный пептид 1	СД – сахарный диабет
ДПП-4 – дипептидил-пептидаза 4 типа	ТБК – тиобарбитуровая кислота
ИФА – иммуноферментный анализ	ТБК-АП – ТБК-активные продукты
ЛО – ложнопериоперированные животные	ТВ – тромбиновое время
ЛП – латентный период	ТЭИ – тест экстраполяции изобавления
МК – мозговой кровоток	УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания
НМК – нарушение мозгового кровообращения	ЕС50 – полумаксимальная эффективная концентрация
ООСА – окклюзия общих сонных артерий	eNOS – эндотелиальная NO-синтаза
ОСМА – окклюзия средней мозговой артерии	IDF – Международная диабетическая федерация
	NO – оксид азота

**Бакулин
Дмитрий Александрович**

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Подписано в печать __.__. 2016 г.
Формат 60x84/16. Печать офсетная Усл. -печ. л. __.
Усл. изд. л. __ Тираж 100 экз. Заказ __
Отпечатано в типографии