

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «РОССИЙСКИЙ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ (РОСБИОТЕХ)»

На правах рукописи

Бороздина Наталья Андреевна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЕПТИДНЫХ
ИНГИБИТОРОВ α -АМИЛАЗ ИЗ *NETELASTIS MAGNIFICA* НА
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА В
КАЧЕСТВЕ ПЕРОРАЛЬНЫХ АНТИГИПЕРГЛИКЕМИЧЕСКИХ
ПРЕПАРАТОВ**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Дьяченко Игорь Александрович

Пушино – 2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	11
1.1 Сахарный диабет.....	11
1.2 Типы сахарного диабета.....	11
1.3 Осложнения сахарного диабета.....	13
1.4 Терапия сахарного диабета.....	16
1.5 Природные источники лекарственных препаратов для лечения сахарного диабета.....	22
1.5.1 Ингибиторы α -амилаз.....	23
1.6 Экспериментальные подходы изучения лекарственных средств для лечения сахарного диабета.....	36
1.6.1 In vivo модели сахарного диабета 2 типа.....	36
1.6.1.1 Комбинирование стрептозотоцина и высокожировой диеты при моделировании сахарного диабета 2 типа.....	37
1.6.1.2 Применение высокожировой диеты на мышах линии C57BL/6J.....	38
Глава 2. Материалы и методы.....	41
2.1 Объект исследования.....	41
2.2 Изучение эффективности Mgf и MgfII на модели гипергликемии при однократном пероральном введении.....	41
2.2.1 Животные.....	41
2.2.2 Дизайн эксперимента.....	42
2.2.2.1 Моделирование гипергликемии.....	42
2.2.2.2 Определение эффективных доз Mgf и MgfII.....	43
2.2.3. Манипуляции с животными.....	44
2.2.3.1 Глюкометрия.....	44
2.2.3.2 Крахмальный тест.....	44
2.2.4 Статистический анализ.....	45

2.3 Изучение эффективности Mgf и MgfII на модели экспериментального сахарного диабета 2 типа	45
2.3.1 Животные	46
2.3.1.1 Стандартная диета	47
2.3.1.2 Высокожировая диета	47
2.3.2 Дизайн эксперимента	48
2.3.2.1 Моделирование экспериментального сахарного диабета 2 типа	48
2.3.2.2 Изучение эффективности MgfII на экспериментальной модели сахарного диабета 2 типа	48
2.3.3 Манипуляции с животными	49
2.3.3.1 Инсулинорезистентный тест	49
2.3.3.2 Регистрация локомоторной и исследовательской активности	50
2.3.3.3 Регистрация мышечной силы в тесте хватания Grip Strength	50
2.3.3.4 Изучение чувствительности к холоду	50
2.3.3.5 Изучение чувствительности к механическому стимулу	51
2.3.3.6 Изучение чувствительности к нагреванию	51
2.3.3.7 Диурез	51
2.3.3.8 Офтальмоскопия	52
2.3.3.9 Забор крови	52
2.3.3.10 Биохимический анализ	52
2.3.3.11 Иммуноферментный анализ сыворотки	52
2.3.3.12 Общий анализ мочи	53
2.3.3.13 Масса органов	53
2.3.3.14 Коллекция органов	53
2.3.3.15 Подсчет диаметра адипоцитов	54
Глава 3. Результаты	55
3.1 Эффективность ингибиторов α -амилаз на экспериментальной модели гипергликемии	55
3.2 Моделирование экспериментального сахарного диабета 2 типа	60

3.3 Эффективность MgfII на экспериментальной модели сахарного диабета 2 типа	65
3.3.1 Влияние MgfII на прирост массы тела	65
3.3.2 Влияние MgfII на потребление корма	66
3.3.3 Антигипергликемические свойства MgfII	67
3.3.4 Влияние MgfII на инсулинорезистентность	70
3.3.5 Эффективность MgfII на чувствительность к холоду, механическому стимулу и нагреванию	72
3.3.6 Влияние MgfII на биохимические показатели липидного обмена в сыворотке крови	74
3.3.7 Влияние MgfII на патофизиологические показатели ожирения	76
Глава 4. Обсуждение результатов	78
ВЫВОДЫ	89
Список сокращений и условных обозначений	91
Список литературы	93

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Глобальный отчет Всемирной организации здравоохранения о сахарном диабете показывает, к 2045 году число людей во всем мире, страдающих сахарным диабетом, может вырасти до почти 700 млн [103, 127]. Множество гипогликемических препаратов с различными механизмами действия сейчас представлены в клинике, которые позволяют продлевать достойное качество жизни, имея сахарный диабет (СД) [38, 163, 164]. Однако каждый гипогликемический препарат имеет свои ограничения в применении и имеется потребность в расширении выбора терапевтической стратегии [1]. Особое внимание в терапии СД необходимо уделять контролированию постпрандиального уровня глюкозы, так как частые гипергликемические состояния могут приводить к развитию ряда осложнений [50, 76, 77, 101, 131, 142, 156].

Степень разработанности выбранной темы

Совсем недавно начались исследования с применением протеомного, транскриптомного и геномного подходов в поиске противодиабетических препаратов. Tysoe и др. впервые описали хелиантамид, высокоэффективный ингибитор панкреатической α -амилазы, который был выделен из актинии *Stichodactyla helianthus*. Он является первым представителем нового структурного класса ингибиторов гликозидаз, который является эффективным относительно амилаз млекопитающих. Обладает термической и кислотоустойчивостью. Хелиантамид таким образом становится пептидом, который может успешно применяться как пероральный гипогликемический препарат в терапии сахарного диабета 2 типа (СД2) [137].

Несмотря на различия в протоколах по выделению и очистке пептидов, достижения в области геномики, протеомики и, в основном, метагеномики, расширяют возможности выделения биоактивных пептидов. Использование метагеномики открыло понимание, что многие морские симбионты способны

синтезировать даже больше биоактивных пептидов, чем предполагалось или выделялось ранее [116].

Большое количество пептидов Кунитц-типа из яда морской анемоны *Heteractis magnifica* было выделено и аннотировано в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН [22]. При проведении протеомного анализа было обнаружено, что два пептида Кунитц-типа, магнификамид (Mgf) (4770 Да, 44 а.о.) и магнификамид-II (MgfII) (4785,5 Да, 44 а.о.), имеют аналогичную на 84% хелиантамиду структуру, ранее открытому высокоэффективному ингибитору α -амилаз [22, 42, 114]. Как и предполагалось, Mgf и MgfII проявили высокую ингибиторную активность *in vitro* в отношении панкреатической и слюнной α -амилаз. Константа ингибирования (K_i) для панкреатической α -амилазы человека у Mgf и MgfII составляют $3.1 \times 10^{-9} \text{М}$ и $7.40 \times 10^{-10} \text{М}$, что на порядки ниже, чем у акарбозы ($K_i = 0.866 \times 10^{-6} \text{М}$), низкомолекулярного ингибитора α -амилаз. Mgf и MgfII стабильны в условиях, свойственных для желудочной среды, что позволяет применять их перорально [66, 114]. Исследование безопасности Mgf демонстрирует отсутствие острой токсичности при внутривенном и пероральном введении мышам в дозах до 2 мг/кг [66]. Открываются перспективы изучения эффективности Mgf и MgfII на *in vivo* моделях сахарного диабета, что имеет научный и прикладной потенциал и является областью интереса в разработке новых противодиабетических препаратов.

Цель исследования

Исследовать эффективность пептидных ингибиторов α -амилаз из *Heteractis magnifica* в отношении физиологических и биохимических показателей на экспериментальном сахарном диабете 2 типа у мышей C57BL/6J при пероральном введении.

Задачи исследования

1. Определить антигипергликемическую активность диапазона доз пептидных ингибиторов альфа-амилаз из *Heteractis magnifica* при их однократном пероральном введении *in vivo*.

2. Исследовать эффективность 2-х и 4-х недельного перорального введения пептидного ингибитора α -амилаз MgfII на обмен глюкозы при моделировании экспериментального сахарного диабета 2 типа у мышей C57BL/6J.

3. Исследовать эффективность 4-х недельного перорального введения пептидного ингибитора α -амилаз MgfII в отношении липидного обмена при моделировании экспериментального сахарного диабета 2 типа у мышей C57BL/6J.

4. Исследовать эффективность 4-х недельного перорального введения пептидного ингибитора α -амилаз MgfII при развитии полинейропатии у мышей C57BL/6J при моделировании экспериментального сахарного диабета 2 типа.

Научная новизна

1. Впервые *in vivo* обнаружена антигипергликемическая активность Mgf и MgfII при их пероральном однократном введении.

2. Впервые показано, что MgfII при многократном пероральном введении на фоне моделирования экспериментального СД2 улучшает обмен глюкозы и облегчает инсулинорезистентность аналогично препарату сравнения метформину.

3. Впервые показано, что пептидный ингибитор α -амилаз MgfII предотвращает развитие признаков ожирения при его многократном пероральном введении на фоне моделирования экспериментального СД2 аналогично препарату сравнения метформину.

4. Впервые показано, что пептидный ингибитор α -амилаз MgfII при его ежедневном пероральном введении в течение 2 и 4 недель эффективно снижает степень развития диабетической нейропатии при моделировании экспериментального СД2 в течение 19 и 21 недели в отношении чувствительности к нагреванию и охлаждению.

Теоретическая и практическая значимость работы

Работа по изучению эффективности ингибиторов α -амилаз *in vivo* является одним из этапов открытия и регистрации новых противодиабетических средств. Результаты, полученные экспериментальным путем, подтверждают эффективность Mgf и MgfII в коррекции метаболических нарушений. Результаты, полученные в работе, позволяют продолжать исследования MgfII в качестве перорального антигипергликемического средства для лечения СД2. MgfII может стать высокоэффективной и безопасной альтернативой для пероральных ингибиторов α -амилаз в лечении СД2.

Методология и методы диссертационного исследования

На первом этапе осуществлялся поиск эффективных доз Mgf и MgfII при их однократном введении у гипергликемических мышей. Гипергликемия у мышей моделировалась путем однократного введения стрептозотоцина (СТЗ) в дозе 150 мг/кг, внутрибрюшинно. Активность ингибирования α -амилаз определялась с помощью проведения крахмального теста: снижение постпрандиального уровня глюкозы при введении крахмала после введения ингибиторов α -амилаз свидетельствует о замедлении расщепления крахмала. Активность различных доз Mgf и MgfII оценивалась в сравнении с акарбозой.

На втором этапе проводилось изучение эффективности ингибиторов альфа-амилаз в выявленной *in vivo* эффективной дозе при длительном применении на модели СД2. Для определения эффективности тестируемых веществ при метаболических нарушениях в работе применялись клинические лабораторные методы, отслеживание изменения массы тела животных, потребления корма, уровня глюкозы в крови, проводились глюкозотолерантный и инсулинорезистентный тесты, висцеральная жировая ткань взвешивалась и проводился подсчет диаметра адипоцитов. Эффективность Mgf и MgfII оценивалась в сравнении с акарбозой, имеющей аналогичный механизм действия, и в сравнении с метформином, гипогликемическим пероральным препаратом первой линии для лечения СД2. Для определения эффективности

тестируемых веществ в развитии осложнений, связанных с метаболическими нарушениями, у животных проводились функциональные тесты.

Положения, выносимые на защиту

1. Изученные пептидные ингибиторы альфа-амилаз Mgf и MgfII, выделенные из *Heteractis magnifica* снижают постпрандиальный уровень глюкозы. Магнификамид-II обладает наиболее выраженными гипогликемическими свойствами.

2. MgfII при многократном пероральном введении эффективно корригирует обмен глюкозы (снижает постпрандиальную концентрацию глюкозы, концентрацию глюкозы натощак, инсулинорезистентность), предотвращает ожирение (снижает прирост массы тела, коэффициент массы висцерального жира и диаметр адипоцитов), а также предотвращает развитие диабетической нейропатии (нормализует чувствительность к нагреванию и охлаждению) у диабетических мышей.

Личный вклад автора

Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора и на данных, полученных при его непосредственном участии на всех этапах исследования. Автор лично проводил поиск и изучение литературных источников, проводил планирование исследований, составлял дизайны и хронологии экспериментов, принимал участие в выполнении экспериментов. Автором проводился статистический анализ всех полученных данных в проведенных исследованиях, описание результатов исследований, подготовка научных публикаций и текста диссертации. Автор принимал участие в публикации результатов и представлении результатов на конференциях.

Степень достоверности и апробация результатов

В представленной работе были использованы современные методы исследования. Исследование проводилось в Лаборатории биологических испытаний Государственного научного центра Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, соответствующей международным требованиям по работе с лабораторными животными и принципам надлежащей лабораторной практики (GLP). Результаты, приведенные в работе, воспроизводимы и проанализированы соответствующими статистическими методами.

Публикации

По теме диссертационного исследования были опубликованы 4 статьи в научных журналах, входящих в перечень ВАК, Scopus и/или Web of Science, 7 тезисов докладов научных конференций международного уровня, и 1 патент Российской Федерации на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы. Общий объем диссертации 112 страниц, включая 3 таблицы, 23 рисунка. Список использованной литературы содержит 174 наименования, из них – 133 зарубежных.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Сахарный диабет

Около 422 миллионов человек во всем мире живут с диабетом, большинство из них проживает в странах с низким и средним уровнем дохода. 1,5 миллионов смертей ежегодно напрямую связаны с диабетом. Как число случаев, так и распространенность диабета неуклонно растут в течение последних десятилетий. Глобальный отчет Всемирной организации здравоохранения о сахарном диабете показывает, что число взрослых, живущих с диабетом, увеличилось почти в четыре раза с 1980 года, до 422 миллионов взрослых и ожидается что их число возрастет до 693 миллионов к 2045 году [103, 127]. Заболевание характеризуется высоким уровнем сахара в крови из-за дефицита концентрации и/или активности инсулина, гормона поджелудочной железы, участвующего в обмене глюкозы [26, 163].

1.2 Типы сахарного диабета

Сахарный диабет 1 типа в первую очередь индуцируется нарушением функции β -клеток поджелудочной железы иммунной системой организма, и известен как инсулинозависимый сахарный диабет [88]. Диабет 1 типа возникает в результате аутоиммунного разрушения островка поджелудочной железы вследствие совокупности множества факторов, таких как генетическая предрасположенность, нарушение иммунного ответа и воздействия окружающей среды. Ряд исследований подтвердил ассоциации диабета 1 типа с аллельными вариантами в областях генов человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) класса I и класса II, генов не-HLA восприимчивости и генов врожденного иммунитета [170]. 1 тип сахарного диабета встречается во всех возрастных группах, но среди детей распространенность выше [88].

СД2 является одним из наиболее распространенных метаболических нарушений во всем мире, и его развитие в первую очередь обусловлено сочетанием двух основных факторов: нарушением секреции инсулина β -

клетками поджелудочной железы и неспособностью инсулиночувствительных тканей реагировать на инсулин [29, 75, 133]. СД2 и его осложнения являются классическими примерами полигенных и сложных заболеваний, возникающих в результате взаимодействия множества генетических факторов и факторов окружающей среды. На сегодняшний день более 128 различных сигналов в 113 локусах связаны с диабетом 2 типа. Большинство этих локусов связаны с развитием β -клеток и чувствительностью к глюкозе, а также с синтезом инсулина, секрецией, передачей сигналов или резистентностью к инсулину. В то время как другие локусы связаны с метаболическими нарушениями, такими как ожирение. Аномальная биология β -клеток является специфичным для диабета фактором, который на фоне ожирения, слабовыраженного воспаления и старения возможно идентифицировать [20, 170]. Избыточный вес или ожирение являются основными факторами риска развития СД2, так как они повышают вероятность развития резистентности к инсулину. Это в свою очередь снижает усваивание глюкозы сердцем или скелетно-мышечными тканями, с одновременным увеличением выработки глюкозы в печени [4, 145]. В связи с этим усиливается секреция инсулина β -клетками. И ранних стадиях сахарного диабета 2 типа гипергликемия и гиперинсулинемия часто сосуществуют [2, 33, 168]. При прогрессировании заболевания функция β -клеток остается сниженной, поэтому терапевтические средства, направленные на функционирование β -клеток и снижающие резистентность к инсулину, являются одним из способов контроля гипергликемии. Некоторые из факторов, которые контролируют функционирование β -клеток, включают окислительный стресс, стресс эндоплазматического ретикулума и аутофагию [5, 23, 88].

Гестационный сахарный диабет определяется как гипергликемия, впервые проявляющаяся во время беременности. Это диабетогенное состояние, характеризующееся множественными гормональными изменениями с повышенной резистентностью к инсулину. У женщин с генетической предрасположенностью к гестационному сахарному диабету это может быть первым проявлением высокого риска развития диабета в последующем.

Потомство имеет повышенный риск родовых травм, а также более высокий риск развития проблем с ожирением и диабетом в более позднем возрасте [88]. В отличие от диабета 2 типа, многочисленные генетические исследования выявили локусы, связанные с гестационным сахарным диабетом или показателями глюкозы во время беременности, которые перекрываются с таковыми для диабета 2 типа [170].

Диабет зрелого возраста у молодых является редкой формой моногенетического диабета из-за изменения одного гена и составляет 1-2% всех случаев диабета. Это группа аутосомно-доминантных заболеваний, характеризующихся неклеточной и/или неострой манифестацией, типичной для СД2, но возникающей в более молодом возрасте, обычно до 25 лет. Из-за быстрой неэффективности пероральных препаратов и/или ранних проявлений у пациентов с диабетом зрелого возраста у молодых может быть ошибочно диагностирован диабет 1 типа. В качестве альтернативы, из-за низкого риска кетоза их можно просто классифицировать как пациентов с СД2. На сегодняшний день большинство данных указывает на множественные мутации и варианты генов, связанные с путями регуляции функционирования β -клеток [170].

1.3 Осложнения сахарного диабета

Вследствие дисфункции инсулина концентрация внеклеточной глюкозы значительно повышена или плохо контролируется. Повышенный уровень внеклеточной глюкозы, или гипергликемия, является отличительной чертой метаболических нарушений при сахарном диабете [74, 76, 77]. Хронические осложнения СД, возникающие в результате гипергликемии, можно разделить на сосудистые и несосудистые. Сосудистые осложнения включают микрососудистые и макрососудистые осложнения [16]. Микрососудистыми осложнениями являются нейропатия, ретинопатия и нефропатия. Макрососудистые осложнения включают заболевания периферических сосудов,

заболевания коронарных артерий и цереброваскулярные заболевания [7]. Гастропарез, изменения кожи и сексуальная дисфункция из-за диабета, классифицируются как несосудистые осложнения. Многонациональное исследование, в которое были включены 28 стран, показало, что макрососудистые осложнения появляются в 27,2% случаев, и микрососудистые осложнения – в 53,5% случаев [81, 138].

Гипергликемия тесно связана с патологией сетчатки, включая прогрессирование от раннего нарушения перфузии сетчатки для надлежащего снабжения кислородом, и до развития отека и накопления жидкости на поздних стадиях заболевания [95, 101, 152]. По актуальным прогнозам, более 60% пациентов с СД2 будут страдать ретинопатией после 20 лет диабета. Окислительный стресс отчетливо наблюдался в сетчатке крыс Льюиса в модели диабета.

Наиболее часто гипергликемия приводит к развитию диабетических нейропатий [6, 79]. Диабетическая нейропатия представляет собой уникальное нейродегенеративное заболевание периферической нервной системы, поражающее преимущественно сенсорные аксоны, вегетативные аксоны и, в меньшей степени, моторные аксоны. Повышение уровня глюкозы приводит к метаболизму глюкозы через полиоловый и гексозаминовый пути, что приводит к увеличению активных форм кислорода (АФК) и воспалению, в основном из-за повреждения митохондрий, что способствует нарастанию неврологического дефицита. Гипергликемия способствует более активному гликированию функциональных белков, что в свою очередь провоцирует выброс провоспалительных цитокинов. Гиперлипидемия в свою очередь также способствует образованию активных форм кислорода, выработке цитокинов, и вызывает развитие местного воспаления [19, 78].

Сама по себе гипергликемия может вызывать воспаление путем активации провоспалительного ядерного фактора транскрипции κB , что приводит к повышенному высвобождению воспалительных хемокинов и цитокинов, включая интерлейкин-6, интерлейкин-8, и фактор некроза опухоли- α [153].

Высокий уровень глюкозы усиливает окислительный стресс, когда скорость производства оксидантов превышает скорость удаления оксидантов [18, 131]. В случае гипергликемии наблюдается как повышенная продукция оксидантов, так и нарушение антиоксидантной защиты за счет множественных взаимодействующих путей [50, 156]. Эти патологические процессы связаны с дисфункцией многих жизненно важных органов: почки, сердечно-сосудистая система, сетчатка и нервная система. Фиброз печени и фиброз легких, когнитивная дисфункция появляются как развивающиеся вторично патологии [78, 123, 142].

Для сахарного диабета характерно замедление заживления ран, так как гипергликемия способствует снижению выработки фактора роста эндотелия сосудов. Такие процессы приводят к гипоксии, которая в свою очередь запускает выработку металлопротеиназ и скорость заживления ран снижается. Несвоевременное лечение ран может приводить к образованию язв у людей с сахарным диабетом. Медленное заживление ран у больных сахарным диабетом иногда сопровождается тяжелыми бактериальными инфекциями [110].

Распространенность сердечно-сосудистых осложнений остается важной проблемой у больных с сахарным диабетом 2 типа [21, 86]. Было подсчитано, что 68% взрослых с диабетом в возрасте старше 65 лет умерли от той или иной формы ишемической болезни сердца, тогда как 16% умерли от инсульта [169]. Гипергликемия часто обнаруживается у больных, госпитализированных по поводу острого ишемического инсульта [35, 89]. На фоне гипергликемии повышенная активность каналов L-типа в гладких мышцах сосудов может способствовать изменению миогенного тонуса и сосудистой реактивности, нарушению тканевой перфузии и артериального давления. Гипергликемия может изменять возбудимость гладких мышц сосудов, влияя на программу сократительных генов [63, 83, 162]. Кроме того, гестационный сахарный диабет связан с повышенным риском развития ишемической болезни сердца у их детей [91].

Помимо традиционных осложнений, в результате СД могут возникать новые осложнения. Популяционные исследования 2018 и 2021 года показывают, что сосудистые заболевания больше не являются причиной большинства смертей среди людей с сахарным диабетом, как это было ранее. В настоящее время рак является основной причиной смерти людей с сахарным диабетом в некоторых странах или регионах, а доля смертей от деменции возросла с начала века. В том числе стоит упомянуть аффективные расстройства и когнитивные нарушения, приверженность к инфекционным заболеваниям, ассоциированные с СД [160].

1.4 Терапия сахарного диабета

Симптомы сахарного диабета 1 типа (СД1) купируются регулярным введением инсулина и модификацией диеты и образа жизни больных [88, 135]. В соответствии с традиционным иммуноцентрическим взглядом на патогенез диабета 1 типа, многие иммуномодулирующие стратегии сосредоточены на антителах, нацеленных на Т-эффекторные клетки. Многие препараты находятся в активной разработке, однако до сих пор эти подходы были лишь частично успешными [70]. Однако имеется информация о том, что стратегии, нацеленной на изменение высвобождения В-клеток, недостаточно. Агенты, направленные на В-клетки, не были протестированы на ранней стадии заболевания, что не позволяет сделать вывод о полезности таких вмешательств для отсрочки или даже предотвращения прогрессирования сахарного диабета на более поздние стадии [58]. Долгосрочные вмешательства в функционирование В- и Т-клеток сопряжены с неотъемлемым риском внесения столь же долгосрочных или даже необратимых изменений в иммунную систему за счет истощения системного пула клеток. Такие изменения могут приводить к менее благоприятному прогнозу при хронических вирусных инфекциях у пациентов с сахарным диабетом 1 типа. Поэтому в терапии активно используются противовоспалительные цитокин-специфические соединения. Блокада или

антагонизм центрального провоспалительного цитокина фактор некроза опухоли α (TNF- α) с помощью инфликсимаба, адалимумаба или этанерцепта с признаками улучшения гликемического контроля и секреции С-пептида. Совсем недавно сообщалось о сохранении С-пептидного эффекта блокады TNF- α при использовании голимумаба через 1 год у детей и молодых людей с диабетом 1 типа [51]. TNF- α , IL-6 (интерлейкин-6) и IL-21 (интерлейкин-21) рассматриваются как перспективные мишени для контролирования иммунного ответа при сахарном диабете 1 типа. Было показано, что ингибирование IL-21 предотвращает СД1 у мышей [106].

В терапии СД2 на данный момент распространенной стратегией является лечение осложнений или предотвращение развития осложнений конкретных органов или тканей-мишеней [31, 36, 37]. В последнее десятилетие было открыто много мишеней в качестве новых пероральных средств для пациентов с СД2. Среди них четыре основных типа мишеней известны как стимуляторы секреции инсулина, имитаторы и сенсibilизаторы инсулина, и блокаторы расщепления крахмала [32, 125].

Стимуляторы секреции инсулина индуцируют секрецию большего количества инсулина β -клетками. Препараты сульфонилмочевины связываются с рецепторами сульфонилмочевины на β -клетках поджелудочной железы и стимулируют их секрецию инсулина. Препараты сульфонилмочевины эффективно снижают осложнения со стороны микроциркуляторного русла, вызванные гликированным гемоглобином, у пациентов с сахарным диабетом 2 типа. Однако их основным недостатком является длительное время связывания с β -клетками, что приводит к длительному высвобождению инсулина [28, 129, 143].

Имитаторы и сенсibilизаторы инсулина – это агенты, которые помогают снизить уровень глюкозы в крови и обычно встречаются в виде пищевых добавок. Они работают, активируя переносчики глюкозы в мышечных и жировых клетках, имитируя таким образом функцию инсулина. Сенсibilизаторы инсулина повышают чувствительность тканей организма к

инсулину. Также было показано, что показатели, такие как повышенный риск свертывания крови, повышенное кровяное давление, липидный профиль, С-реактивный белок, липопротеины низкой плотности, сывороточный фибриноген и аномальное утолщение сердечной мышцы, улучшаются при использовании сенситизаторов инсулина [3, 9, 25, 111]. Метформин в настоящее время является препаратом первого выбора и наиболее часто используемым противодиабетическим лекарственным средством. Первоначально метформин был получен из галегина, обнаруженного в *Galega officinalis* [56].

GLP-1 (глюкагоноподобный пептид-1) и GIP (глюкозозависимый инсулиотропный пептид) являются важными инкретиновыми гормонами, которые оказывают хорошо охарактеризованное действие на высвобождение инсулина [128] и их ингибитором дипептидилпептидазой-4. GLP-1 является одним из инкретиновых гормонов, отщепляется от про-глюкагона и секретируется L-клетками в дистальном отделе подвздошной кишки и толстой кишке. GLP-1 высвобождается после приема пищи и обнаруживается в жировой ткани. GLP-1 задерживает опорожнение желудка, увеличивает секрецию инсулина и снижает секрецию глюкагона. Более глубокое понимание биологии и метаболизма инкретинов ускорило разработку и использование аналогов, миметиков и агонистов инкретинов и ингибиторов дипептидилпептидазы-4. Сообщается, что GIP стимулирует глюкозозависимую секрецию инсулина у людей. Кроме того, он играет роль в метаболизме жиров в адипоцитах и оказывает пролиферативное действие на β -клетки [8, 13].

Натрийзависимые котранспортеры глюкозы (SGLT) представляют собой семейство переносчиков глюкозы, обнаруженных в слизистой оболочке кишечника тонкой кишки (SGLT1) и проксимальных канальцах нефрона (SGLT2 и SGLT1). Они способствуют реабсорбции основного количества глюкозы в почках. Ингибиторы SGLT2 снижают реабсорбцию глюкозы в проксимальных канальцах почек, что выводит ее с мочой. Селективное ингибирование SGLT2 в проксимальных канальцах увеличивает экскрецию глюкозы с мочой, но эти препараты эффективны только при состояниях гипергликемии. Ингибиторы

натрий-глюкозного котранспортера типа 2 (SGLT2) представляют собой еще один недавно открытый класс препаратов, изменяющих метаболизм глюкозы [88].

Другим важным классом являются ингибиторы α -гликозидазы и ингибиторы α -амилазы, действие которых заключается в замедлении расщепления и всасывания углеводов. Наиболее распространенными препаратами ингибиторов α -гликозидаз являются акарбоза и миглитол [15, 118]. α -Амилаза представляет собой фермент, который может гидролизовать α -D-(1,4)-гликозидные связи в крахмале или полисахаридах, расщепляя их до олигосахаридов. Крахмал и полисахариды должны быть гидролизованы до дисахаридов и олигосахаридов, которые затем гидролизуются ферментом α -гликозидазы до молекул моносахаридов, которые всасываются в портальную вену печени через тонкий кишечник [52, 60]. Ингибиторы α -амилаз и α -гликозидаз могут препятствовать активности амилазы. Ли и др. [140] обнаружили тип флавоноидов, который может ингибировать α -амилазу, α -гликозидазу и альдозоредуктазу. Акарбоза, природный ингибитор α -гликозидаз, была обнаружена у бактерии [61]. Акарбоза структурно похожа на природные олигосахариды, но имеет в 10^4 - 10^5 раз большее сродство к α -гликозидазам. То есть, эти комплексы ферментов конкурентно ингибируются и их доступность для олигосахаридов из пищевого крахмала снижается, в следствие чего снижается образование моносахаридов, и для дальнейшего метаболизма требуется меньше инсулина, что приводит к уменьшению постпрандиального повышения уровня глюкозы и инсулина в крови, вызванного приемом пищи [37]. Эффективность α -гликозидаз представляет собой не классическое снижение уровня глюкозы в крови за счет увеличения секреции инсулина как реакции на повышение уровня глюкозы в крови, а снижение подъема уровня глюкозы в крови. Поскольку снижение концентрации глюкозы в крови приводит к значительному снижению стимуляции синтеза и секреции инсулина, гиперинсулинемия, вызванная резистентностью к инсулину, также уменьшается [144]. Учитывая, что акарбоза действует в кишечнике, при длительном лечении

ее можно комбинировать со всеми другими противодиабетическими средствами для усиления эффективности без появления нежелательных явлений [143]. Результаты крупномасштабных контролируемых испытаний и исследований по наблюдению, а также постмаркетинговый опыт показывают, что акарбоза является одним из самых безопасных противодиабетических средств, как отдельно, так и в комбинации [143]. Однако акарбоза имеет некоторую токсичность и побочные эффекты, такие как диарея, боль и дискомфорт в животе, из-за чего длительное применение подходит не всем пациентам [140]. Наиболее частыми побочными эффектами акарбозы являются вздутие живота и повышенное утомление [54]. Вероятность возникновения отсроченных гепатотоксических явлений при длительном применении акарбозы по-прежнему высока [44]. Вздутие живота является наиболее распространенной побочной реакцией пищеварительной системы на акарбозу. Однако в сочетании с сульфонилмочевинной, метформином или инсулином акарбоза может легко привести к гипогликемии [43]. Комбинированное лечение метформином и акарбозой оказалось более эффективным у больных СД2, чем монотерапия метформином или акарбозой. Кроме того, с увеличением сроков лечения до 6 месяцев различия в эффективности между комбинированной терапией и монотерапией метформином уменьшались [121].

Несмотря на существующие терапии сахарного диабета, ведутся поиски более эффективных лекарственных средств с минимальными побочными эффектами при их длительном применении, а также мишеней для разработки новых терапевтических стратегий. В качестве перспективной мишени для терапии сахарного диабета 2 типа рассматривается фермент 11 β -гидроксистероиддегидрогеназа, которая катализирует превращение неактивного кортизона в активный кортизол [70]. Фермент глутаминфруктозо-6-фосфатаминотрансфераза считается важной терапевтической мишенью против СД2, так как он играет центральную роль в пути биосинтеза гексозамина, и участвует в катализе первой и ограничивающей скоростью стадий образования гексозамина [148]. Протеинтирозинфосфатаза 1В и тирозинфосфатаза

регулируют инсулинорезистентность [151]. Протеинтирозинфосфатаза 1В дефосфорилирует остатки фосфор-тирозина в сегментах активации киназы рецептора инсулина, что приводит к негативной регуляции передачи сигналов инсулина [150]. Сверхэкспрессируемый ген нефробластомы представляет собой богатый цистеином белок, который участвует в функциях регуляции роста клеток. При исследовании сверхэкспрессируемого гена нефробластомы в сыворотке у пациентов с недавно диагностированным СД2 в сравнении со здоровыми субъектами контроля замечено, что уровни сверхэкспрессируемого гена нефробластомы были значительно повышены у пациентов с СД2. Эти данные позволяют предположить, что сверхэкспрессируемый ген нефробластомы может быть вовлечен в резистентность к инсулину, связанную с ожирением, и может служить важной мишенью для терапии СД2 [149]. FoxO1 (forkhead box protein O1) в поджелудочной железе ответственен за дисфункцию β -клеток, индуцируя стресс и апоптоз. FoxO1 активируется в диабетической печени во время состояний, подобных окислительному стрессу, и увеличивает активацию многих генов глюконеогенеза и детоксикации АФК [107]. Свободные жирные кислоты (FFA) связываются с рецепторами FFA1, FFA2 и FFA3. Так как FFA1 экспрессируются на β -клетках поджелудочной железы, то он может играть роль в регуляции выработки инсулина. Танг и др. показали, что рецепторы FFA2 и FFA3 на β -клетках поджелудочной железы человека ингибируют секрецию инсулина [113]. Эпоксидикозатриеновые кислоты вырабатываются в ответ на действие агонистов ацетилхолина или брадикинина, а также при выработке арахидоновой кислоты. Введение эпоксидикозатриеновых кислот мышам с ожирением вызывало уменьшение висцерального подкожного жира и повышение чувствительности к инсулину [172]. Коактиватор гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом 1-альфа, регулирует выработку инсулина, поддерживает энергетический обмен в митохондриях, регулирует метаболические нарушения в адипоцитах [11, 73, 136]. Гама-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, PPARs) является одной из важнейших ядерных мишеней для

тиазолидиндионов. Специфическое удаление PPARs из различных клеток-мишеней, таких как жировая ткань, мышцы, макрофаги и мозг, изменяет обмен глюкозы. Однако тиазолидиндионы могут провоцировать развитие сердечной недостаточности, ожирение, рак мочевого пузыря [107]. Глюкокортикоидный рецептор повышает инсулинорезистентность как при воздействии эндогенных, так и синтетических глюкокортикоидов [157]. Глюкокортикоиды повышают уровень глюкозы в крови в моменты адаптации и стресса, но хроническая активация этих рецепторов может вызывать инсулинорезистентность [107]. Ядерный фактор, связанный с эритроидным фактором 2, обеспечивает цитопротекцию при многих заболеваниях и является ключевым игроком в адипогенезе или других метаболических нарушениях, и поэтому рассматривается как новая терапевтическая мишень [161].

1.5 Природные источники лекарственных препаратов для лечения сахарного диабета

Необходимость в разработке терапевтических препаратов с меньшим количеством побочных эффектов до сих пор не удовлетворена из-за ограниченной эффективности или неприемлемых недостатков, включая побочные эффекты и лекарственную устойчивость в имеющихся в настоящее время терапевтических препаратах [165]. Традиционно целью разработки лекарств было выборочное воздействие на один биологический объект, чтобы избежать влияния других взаимодействий, которые потенциально могли привести к нежелательным побочным эффектам. В прошлом терапевтические средства растительного происхождения широко игнорировались как возможные экономически эффективные средства лечения диабета, и поэтому доказательная документация эффективности обычно недоступна [70, 117]. Однако этот подход в настоящее время считается устаревшим, и за последние годы основные усилия в разработке лекарственных препаратов были направлены на разработку соединений, способных оказывать многочисленные физиологические действия,

особенно при заболеваниях сложной этиологии, в том числе при сахарном диабете [12, 163]. В последнее время прослеживается тенденция поиска природных антидиабетических препаратов из природного сырья, в том числе белковой природы. Некоторые из них уже показали потенциал в снижении гипергликемии [115, 134, 139, 140, 163].

Природные компоненты становятся многообещающим пулом для открытия структур с высоким разнообразием и различной биологической активностью, которые могут быть непосредственно разработаны или использованы для поиска новых лекарств. Разработка лекарств по-прежнему сталкивается жестким отсевом, ограниченной доступностью и устойчивостью поставки. Тем не менее, уже сегодня научно-технические достижения позволяют трансформировать традиционную медицину в источник для поиска лекарств на основе природных компонентов [12, 31, 102].

1.5.1 Ингибиторы α -амилаз

Амилаза широко распространена почти во всех организмах. В соответствии с различными способами действия амилаз на крахмал их классически делят на три основные категории: α -амилаза, β -амилаза и γ -амилаза. Среди этих категорий α -амилаза (1,4- α -D-глюкан-глюканогидролаза) является наиболее распространенным типом и представляет собой внеклеточный фермент, гидролизующий молекулы крахмала и гликогена. Этот фермент расщепляет α -1,4-гликозидные связи в длинноцепочечных сахарах на глюкозу, мальтозу, мальтотриозу и α -предельный декстрин. Амилаза играет важную роль в углеводном обмене *in vivo*, поэтому гены α -амилазы могут быть обнаружены у различных организмов, от бактерий, грибов и растений до животных [90].

В связи с широкой распространенностью амилазы, участвующей в усваивании из пищи сложных углеводов, у многих организмов выработался механизм защиты от определенных амилаз других организмов, стоящих выше них в пищевых цепочках. Так, ингибиторы α -амилаз широко распространены в

семенах злаков, которые защищают их от плесени, бактерий и травоядных животных, которым необходима амилаза для усваивания крахмала из семян [84]. Ингибиторы α -амилазы уже давно предлагаются в качестве возможного важного оружия против вредителей, диета которых делает их сильно зависимыми от активности α -амилазы [124]. Некоторые из этих пептидов развились как специфические ингибиторы α -амилаз конкретного хищника, в то время как другие были разработаны с дополнительной функцией, такой как сопутствующее ингибирование протеазы. В то время как большинство пептидных ингибиторов амилазы получают из высших растений, наиболее сильнодействующий из известных ингибиторов человеческой панкреатической α -амилазы (НРА), тендамистат, представляет собой пептид из *Streptomyces tenae*. Тендамистат представляет собой пептид из 74 остатков с двумя дисульфидными связями. По крайней мере, он равен эффективности тендамистата (K_i оценивается в 9–200 пМ). Тендамистат в клинических испытаниях продемонстрировал значительное снижение уровня глюкозы в плазме крови, однако он иммуногенен и его структура легко разрушается, что препятствует его применению в клинике [141].

1.5.1.1 Типы белковых ингибиторов α -амилаз

Белковые ингибиторы α -амилазы подразделяются на семь типов, в зависимости от их происхождения и структуры: микробный тип, узелковый тип, γ -тиониноподобный тип, зерновой тип, Кунитц-тип. Из-за своей консервативной природы в эволюции α -амилаза имеет сходные каталитические остатки с амилазами из разных источников. Активные центры амилаз обычно состоят из трех аминокислот, а именно Asp, Glu и Asp. Сайт связывания α -амилазы может содержать не менее шести моносахаридных структур и расщепляет связи между третьим и четвертым остатками пиранозы по механизму двойного смещения. Например, тройной каталитический сайт Glu233 в α -амилазе поджелудочной железы свиньи и Arg19 в тендамистате (ингибиторе стрептомицетов) образуют

солевой мостик, а Arg7 в аминокислотной идентичности ингибитора α -амилазы амаранта образует солевой мостик с Asp287 [140].

Большое разнообразие белковых ингибиторов α -амилазы происходит от генов α -амилазы рода *Streptomyces*, таких как тендамистат, парвуластат, AI-409, AI-3688, T-76, MA-4680. Ингибиторы α -амилазы *Streptomyces* обычно состоят из 75 аминокислот, которые были выделены из различных стрептомицетов [100]. Они имеют примерно 30% сходства последовательностей со структурой, которая демонстрирует две β -бочкообразные складки и состоит из пары скрученных листов. Каждый скрученный лист состоит из трех антипараллельных β -листов и соединяется дисульфидными мостиками [173]. В одном исследовании тендамистата, когда белок был расщеплен для получения различных пептидов, было изучено взаимодействие амилазы между циклическим и линейным пептидом, и была обнаружена важность орбитали [67]. Ингибиторы α -амилазы получают путем переноса генов, ингибирующих амилазу, в бактерии. Остатки содержат консервативную аминокислоту, включая Trp-Arg-Tyr, где ингибитор взаимодействует с амилазой млекопитающих, а также оказывает ингибирующее действие на амилазу насекомых [140].

AAI (Alpha-Amylase Inhibitor) узелкового типа является наименьшим из когда-либо найденных ингибиторов α -амилазы, имеет 32 остатка и 3 дисульфидные связи. Методом ядерного магнитного резонанса, в структуре белка определена десминовая укладка, три антипараллельные цепи и характерная дисульфидная топология [140]. AAI оказывает специфическое ингибирующее действие только на α -амилазу насекомых [57].

γ -Тионин представляет собой богатый цистеином пептид массой 5 кДа с определенной долей гидрофобной аминокислоты, вторичная структура состоит из трехцепочечного антипараллельного β -листа, соединенного тремя дисульфидными связями с α -спиралью, конфигурация представляет собой мотив $\alpha\beta$ ($CS\alpha\beta$), стабилизированный цистеином. Структура α -ядра представляет собой петлю, состоящую из первой β -цепи и спирали, тогда как структура γ -ядра

представляет собой область, содержащую петлю-шпильку и соединяющую вторую и третью β -цепи [140].

Наиболее изученными являются экзогенный ингибитор α -амилазы пшеницы 0.19 и бифункциональный ингибитор α -амилазы/трипсина *Eleusine coracana Gaertn.* Ингибитор α -амилазы пшеницы 0.19 состоит из 124 аминокислот, включает пять спиралей и пять дисульфидных связей. Бифункциональный ингибитор трипсина α -амилазы представляет собой стабильный мономер, состоящий из 122 аминокислот, который может конкурентно ингибировать различные амилазы, нарушая контакт между субстратом и ферментом и снижая сродство фермента к субстрату [140, 147].

Ингибиторы α -амилаз Кунитц-типа содержат около 180 аминокислот и четыре цистина. Результаты исследования с использованием кругового дихроизма показали, что доля β -листов во вторичной структуре ингибитора Кунитц-типа составляет 39%, и белок обладает высокой термостабильностью с сохранением дисульфидной связи между Cys44 и Cys91. Наиболее широко изучен ингибитор α -амилазы/субтилизина ячменя, структура которого имеет две дисульфидные связи и β -листы сложены в узел-трилистник. Механизм, с помощью которого ингибитор α -амилазы/субтилизина ячменя ингибирует амилазу, отличается от механизма некоторых других ингибиторов, которые не вступают в прямой контакт с сайтами связывания амилазы, вместо этого образуя 12 водородных связей, два солевых мостика и множественные электростатические силы. Полость на границе раздела фермент-ингибитор содержит ион кальция, который может укрепить сеть молекул воды на границе раздела комплекса и улучшить стабильность комплекса [140].

1.5.1.2 Белковые ингибиторы α -амилаз из морских организмов

Морские организмы являются наиболее многообещающим известным источником биоактивных пептидов, поскольку они представляют более половины биоразнообразия в мире [116]. Океаны представляют собой набор

уникальных условий для развития жизни с точки зрения вариаций давления, солености, освещения и температуры, которые позволили спонтанно появиться различным классам морских пептидов, выделены из рыб, ракообразных, моллюсков, водорослей, кораллов и других морских видов [146]. В условиях водной среды высокая степень конкуренции и антагонизма между видами и воздействие патогенных микроорганизмов позволили появиться пептидам с существенно отличающимся составом, последовательностью, структурой и конформацией пептидов с аналогичной функцией, обнаруженных в наземных организмах [158, 159]. Исходя из широких и многогранных взаимодействий организмов между собой, на данный момент организмы становятся источником большого количества разнообразных ингибиторов α -амилаз [90].

Таким образом, морские пептиды обычно обладают множественными биологически активными свойствами. Так, совсем недавно начались исследования с применением протеомного, транскриптомного и геномного подходов. Из водоросли *Porphyra spp.* Habtamu Admassu и др. выделили ингибитор α -амилазы. *Porphyra spp.* является традиционной пищей в азиатских странах и долгое время считалась полезной для снижения уровня сахара в крови. В эксперименте *in vitro* продемонстрирована ингибиторная активность экстракта водоросли по отношению к α -амилазе [102]. Tysoe и др. впервые описали хелиантамид, высокоэффективный ингибитор панкреатической α -амилазы, который был выделен из актинии *Stichodactyla helianthus*. Он является первым представителем нового структурного класса ингибиторов гликозидаз, который является эффективным относительно амилаз млекопитающих, и обладает термической и кислотоустойчивостью. Хелиантамид таким образом становится пептидом, который может успешно применяться как пероральный гипогликемический препарат в терапии сахарного диабета [137]. Хелиантамид обладает равной или большей активностью, чем тендамистат, но в отличие от предшественника, его структура невероятно стабильна благодаря своему β -дефенсиновому фолду. Эта структурная особенность может устранить проблемы иммуногенности, возникающие при применении тендамистата. Кроме того,

хелиантамид устойчив к протеолитическому расщеплению, длительному воздействию низкого pH и высокой температуры, что открывает возможность использования пептида для перорального введения [137, 174].

Скрининговые библиотеки пополняются природными компонентами, а также их гибридами, аналогами и молекулами, вдохновленными структурой и функционированием природных компонентов [130].

Хотя большое количество биоактивных пептидов уже выделено из морских организмов, считается, что в океанах еще предстоит открыть много новых молекул [116]. Комбинаторная химия, высокопроизводительный скрининг, биоинформатика, протеомика и геномика широко применяются в области поиска полезных пептидов. Применяются методы ядерно-магнитного резонанса (ЯМР), количественная взаимосвязь между пространственной структурой и активностью (3D-QSAR), физико-химическое моделирование и компьютерный дизайн с использованием различного программного обеспечения, открываются возможности предсказания токсичности и метаболизма веществ. В целом, подходы направлены на определение мишеней лекарственных средств и определение структур новых мишеней. Программные обеспечения для докинга можно найти в свободном доступе, например, Zinc.docking.org. Он используется для расчета физико-химических свойств лекарств, формулы системы упрощённого представления молекул в строке ввода (SMILES), свойств сходства лекарств и многого другого [130]. Технологии открытия лекарств значительно продвинулись и диверсифицировались. Однако некоторыми из узких мест в поиске новых природных полезных молекул для выделения и характеристики морских пептидов являются необходимость улучшения протоколов экстракции и очистки этих молекул из их первичных источников, а также ограничения существующих производственных технологий, которые ограничивают использование большего количества морских пептидов для человека. здоровье и питание [159]. Несмотря на различия в протоколах по выделению и очистке пептидов, достижения в области геномики, протеомики и, в основном, метагеномики расширяют возможности выделения биоактивных пептидов.

Использование метагеномики открыло понимание, что многие морские симбионты способны синтезировать даже больше биоактивных пептидов, чем предполагалось или выделялось ранее [116].

Диабет является хроническим заболеванием, где пациенты осведомлены о том, что лечение требуется соблюдать на протяжении всей жизни, и это в свою очередь может повлиять на приверженность к длительной терапии [143]. В настоящее время недостаточно исследованы побочные реакции комбинированных препаратов, поэтому следует уделять больше внимания вопросам безопасности при длительном применении, особенно исследованиям лекарственных взаимодействий [43]. Перспектива исследования новых лекарств должна включать изучение влияния на смертность, развитие сердечно-сосудистых и микрососудистых осложнений. Необходимы исследования, обеспечивающие восполнение пробела в изучении долгосрочной сравнительной эффективности и безопасности лекарств от сахарного диабета [88].

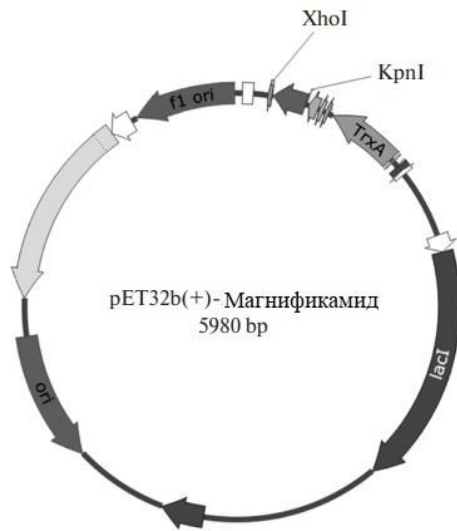
1.5.1.2.1 Магнификамид и магнификамид-II

Магнификамид с молекулярной массой 4770 Да, был выделен в 2018 году из яда морской анемоны *Heteractis magnifica* наряду с нейротоксинами, его структура была охарактеризована Синцовой и др. в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН им. Г. Б. Елякова [14, 42]. Также коллективом авторов из в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН им. Г. Б. Елякова из яда актинии *Heteractis magnifica* выделен новый близкий гомолог хелиантамида и Mgf, названный магнификамидом-II, который ингибирует α -амилазы [10].

Рекомбинантный Mgf был получен из синтетического гена, который экспрессировался в бактериальной системе *Escherichia coli* в составе гибридного белка с тиоредоксином и полигистидиновой последовательностью (Рисунок 1). С помощью металлоаффинной хроматографии белок выделялся из клеточного лизата, и для увеличения выхода использовалась стадия рефолдинга с

использованием окисленного и восстановленного L-глутатиона. Методом обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) на колонке Jupiter C4 рекомбинантный Mgf очищали дважды, время удерживания целевого пептида составляло 30 мин. С помощью масс-спектрометрии была подтверждена чистота рекомбинантного Mgf, так как полученная молекулярная масса пептида, составляющая 4770,6 Да, соответствовала расчетной массе (Рисунок 2) [22, 114].

А



Б

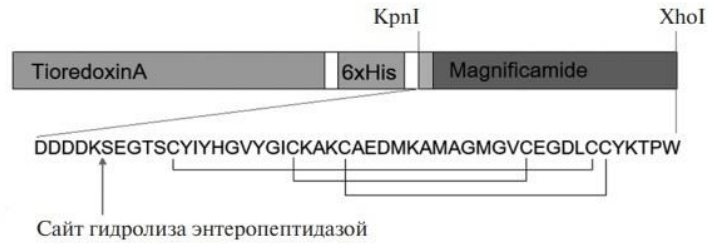


Рисунок 1 – Синтез рекомбинантного Mgf [14]

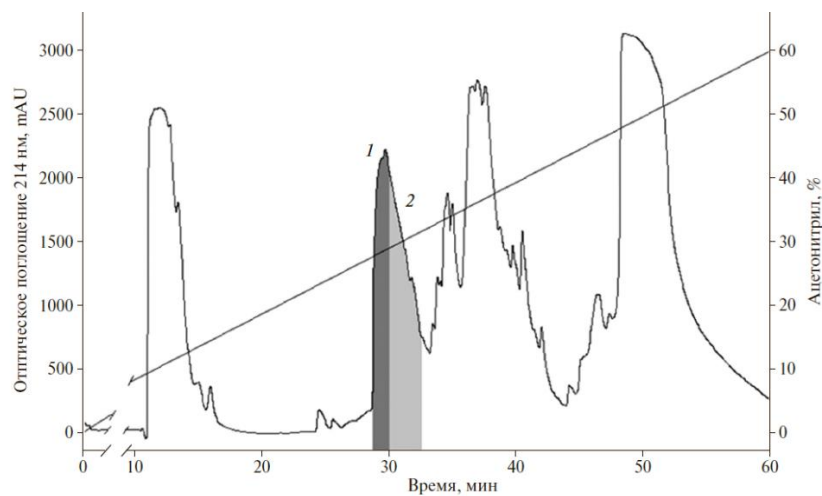
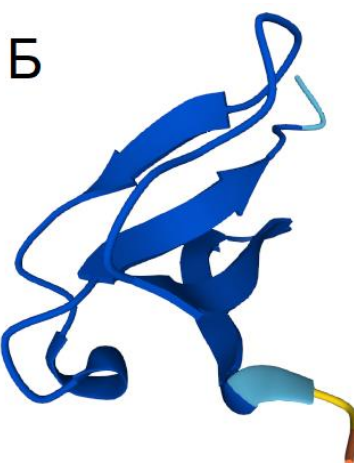


Рисунок 2 – Очистка рекомбинантного Mgf [14]

Методом ЯМР-спектроскопии проведена рентгеноструктурная характеристика Mgf, где было определено наличие упорядоченной бета-структуры Mgf [114]. Mgf представляет собой пептид из 44 аминокислотных остатков, имеющий три дисульфидные связи (Рисунок 1), что обеспечивает его высокую стабильность, но также препятствует получению пептида с правильной укладкой при экспрессии.

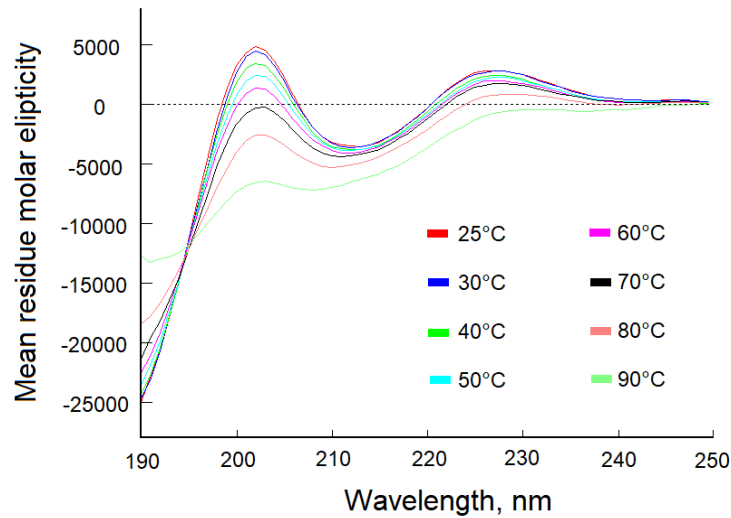
Структура Mgf аналогична на 84% с хелиантамидом, первым описанным ингибитором α -амилаз. Последовательность четырех аминокислот YIYN, входящая в состав Mgf и хелиантамида, взаимодействует с консервативными остатками активного центра α -амилазы [114, 137]. Монбретин А, сложное производное флавонолгликозида из семейства растений *Crocasmia*, был обнаружен при скрининге экстрактов наземных растений и имеет K_i 8 нМ против панкреатической амилазы человека. Было показано, что фенольные мотивы необходимы для ингибирования и непосредственно взаимодействуют с консервативными карбоновыми кислотами активного центра амилазы. Наложение связанной структуры монбретина А с ингибирующим мотивом хелиантамида показывает схожую ориентацию ингибирующих фрагментов, их гидроксильные группы выстраиваются так, что обе взаимодействуют с каталитическим нуклеофилом Asp197 амилазы. Это слияние ингибирующих мотивов из отдаленных природных источников указывает на очень многообещающий фармакофор для специфического ингибирования амилаз. Наложение ингибиторного мотива хелиантамида на структуру низкомолекулярного ингибитора α -глюкозидазы акарбозы приводит к очень небольшому перекрытию функциональных групп. В отличие от акарбозы, монбретин А и хелиантамид не имитируют олигосахаридный субстрат по структуре или связыванию, что, вероятно, играет роль в их специфичности в отношении α -амилазы [137].

Структуры новых пептидных ингибиторов стабилизированы тремя дисульфидными связями (Рисунок 3), что также играет важную роль в проявлении ингибиторной активности пептидов, так как ранее обнаружено, что нарушение дисульфидных связей заменой цистеинов в хелиантамиде сильно снижает эффективность по сравнению с диким типом [137]. Этот факт свидетельствует о том, что взаимодействие может быть связано не только с узнаванием и связыванием остатков реактивного центра, но и с участием более протяженного интерфейса на молекулах ингибитора и α -амилазы [114].



Термическую стабильность Mg²⁺ изучали как с помощью спектроскопии кругового дихроизма, так и методом ферментативного ингибирования. Спектры кругового дихроизма Mg²⁺, растворенного в воде, не показали существенных изменений после нагревания до 50 °С (Рисунок 4, а). Содержание α -спиралей в структуре Mg²⁺ невелико и, по-видимому, они не имеют решающего значения для проявления активности. Эти данные были подтверждены анализом ингибирования панкреатической свиной α -амилазы (PPA). Показано, что Mg²⁺ полностью ингибирует α -амилазу после нагревания в диапазоне температур до 80 °С. Его активность снизилась на 3% после нагревания до 90°C и на 12% после нагревания до 100°C (Рисунок 4) [114].

А



Б

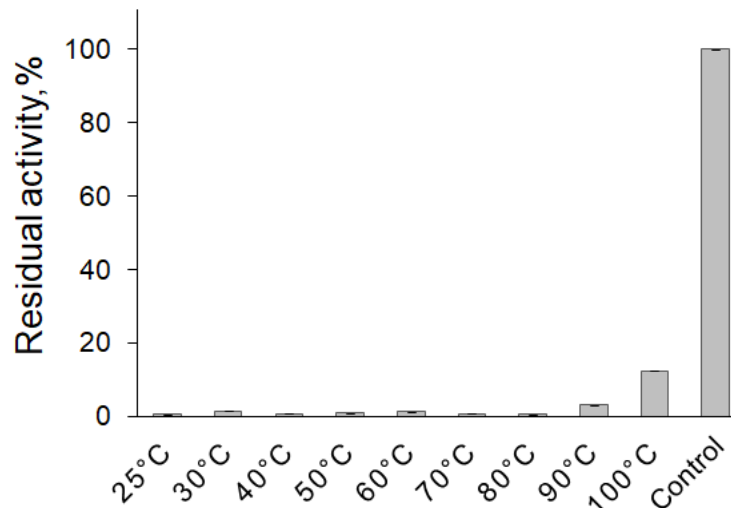


Рисунок 4 – Влияние температуры на вторичную структуру (А) и биологическую активность Mgf (Б) [66]

Высокая устойчивость к нагреванию Mgf, и других пептидов Кунитц-типа из актиний связана со стабилизацией структуры тремя дисульфидными связями. При исследовании хелиантамида также была продемонстрирована наивысшая кислотоустойчивость β -дефензин-подобных ингибиторов [137]. Mgf, аналогично хелиантамиду, обладает высокой термостабильностью в дополнение к устойчивости к протеолитической деградации и длительному воздействию низкого pH [137], что делает возможным их пероральное введение в экспериментах *in vivo* [114].

В эксперименте острой токсичности Mgf при однократном введении в дозах 0,5 мг/кг, 1 мг/кг и 2 мг/кг не оказывает видимого токсического действия как при пероральном, так и при внутривенном введении животным. Через 24 часа при вскрытии и осмотре внутренних органов не обнаружено видимых признаков гепато-, кардио-, нефротоксичности и интоксикации желудочно-кишечного тракта или проявлений воспалительного процесса. При пероральном введении Mgf в дозах 0,005 мг/кг, 0,01 мг/кг и 0,1 мг/кг не оказывает угнетающего или возбуждающего действия на центральную нервную систему животных. Отсутствие достоверных различий в «открытом поле» и «крестообразном лабиринте» свидетельствует об отсутствии влияния пептида на исследовательскую активность и эмоциональное состояние животных. Таким образом, Mgf во всех исследованных дозах не оказывает нейротропного или нейротоксического действия и безопасен для нервной системы [66].

Синцовой и др. в 2019 году проводилось «сравнение эффективности рекомбинантного Mgf с активностью акарбозы, входящей в состав фармацевтических препаратов PrecoseTM и GlucobayTM, были определены значения K_i РРА и человеческой слюнной α -амилазы (HSA). Установлено, что Mgf является прочно связывающимся ингибитором, а значения K_i , определённые по уравнению Моррисона составили 0,17 нМ для РРА и 7,7 нМ для HSA» (Рисунок 5). «Ингибиторная активность Mgf значительно превосходит активность акарбозы, действующего вещества лекарственных препаратов PrecoseTM и GlucobayTM, константы ингибирования K_i которой составляют 0,797 и 1,265 мкМ для РРА и HSA соответственно. Эти значения показывают превосходство активности Mgf по сравнению с активностью акарбозы, у которой K_i составляют 1,265 и 0,797 мкМ для HSA и РРА соответственно» [14, 66, 170]. Константа ингибирования Mgf против НРА составляет $3,1 \pm 0,65$ нМ (рис. 5), что на два порядка выше, чем K_i хелиантамида из актинии *Stichodactyla helianthus* (0,01 нМ) [137]. Хелиантамид и Mgf являются мощными ингибиторами α -амилаз. Их значения K_i в отношении ферментов НРА, HSA и РРА были оценены как $10^{-9} \text{M} \leq K_i \leq 10^{-11} \text{M}$. Значение K_i является ключевым параметром,

характеризующим силу ингибирования, и указывает на то, что хелиантамид и MgI являются ингибиторами прочного связывания [66].

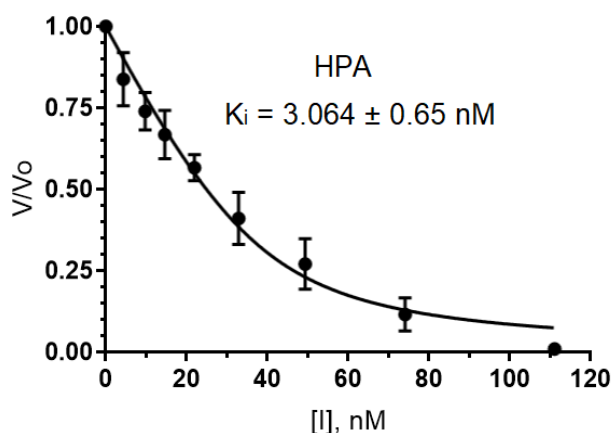


Рисунок 5 – Ингибиторная кривая человеческой панкреатической α -амилазы (HPA) [66]

1.6 Экспериментальные подходы изучения лекарственных средств для лечения сахарного диабета

1.6.1 In vivo модели сахарного диабета 2 типа

Патофизиология СД2 основана главным образом на снижении чувствительности тканей к инсулину, что приводит к гиперинсулинемии и в последующем – к снижению способности вырабатывать инсулин. Таким образом, неспособность регулировать гипергликемию инсулином приводит к развитию осложнений, таких как нефропатия, ретинопатия и полинейропатия [138]. На фоне изменений углеводного обмена, происходят нарушения липидного обмена: повышение в сыворотке крови триглицеридов, общего холестерина и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП).

Создание животной модели, отражающей основные клинические проявления СД2, является важным этапом для поиска новых терапевтических стратегий. Кроме того, животные модели могут позволить более углубленно понять механизмы патологического изменения сигнальных путей, что является фундаментальным знанием [39]. Разработаны различные методы создания

экспериментального СД2, такие как животные модели ожирения, высокожировая диета (ВЖД), сахарный диабет без ожирения, генетические животные модели. Большинство моделей нацелены на имитацию не только внутренних факторов патологии развития СД2, но и на внешние факторы ожирения [19, 132].

1.6.1.1 Комбинирование стрептозотоцина и высокожировой диеты при моделировании сахарного диабета 2 типа

Распространенным методом моделирования СД2 является комбинация ВЖД и инъекции СТЗ в невысоких дозах у крыс и мышей. Дозы для внутривентриального введения СТЗ более 45 мг/кг на фоне ВЖД вызывали гипергликемию у крыс, но эти животные не реагировали на стандартное лечение метформином, что может быть связано с возникновением СД1 [97]. Имеются данные о комбинации ВЖД с другими дозами СТЗ, такими как 25 мг/кг [49], 35 мг/кг и 40 мг/кг [65, 53]. В таких случаях СТЗ вводится однократно, и ВЖД соблюдается в течение 5-8 недель. При таких дозах СТЗ авторы наблюдали развитие стандартных признаков экспериментального СД2, таких как ожирение, повышение постпрандиального уровня глюкозы, повышение инсулинорезистентности, маркеры нарушения липидного обмена в сыворотке крови [49]. С дозой СТЗ, равной 35 мг/кг, в сочетании с ВЖД, авторам удалось достичь развития остеопороза у животных, что также является осложнением при СД2. Авторы связывают развитие такого осложнения с лептинорезистентностью [71]. Повышение дозы СТЗ до 50 мг/кг при однократном введении у крыс и комбинация с ВЖД также демонстрирует повышение уровня гликированного гемоглобина (HbA1c), и повышение в сыворотке крови холестерина, ЛПНП и липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), что является маркерами метаболических нарушений при СД2 [167].

1.6.1.2 Применение высокожировой диеты на мышах линии C57BL/6J

Проанализировав опубликованные исследования по моделированию СД2, можно заметить наличие большого количества исследований именно на мышах линии C57BL/6. Выбор исследователей останавливается на этих мышах в связи с их предрасположенностью к развитию лептинорезистентности. Например, опубликована модель, в которой мышам линии C57BL/6J СТЗ вводили однократно дозе 65 мг/кг, и содержали их на ВЖД в течение 8 недель. Результатом стали гипергликемия и гиперинсулинемия, а также ожидаемое повышение уровня резистина и лептина [55]. Встречаются введения СТЗ мышам дважды или многократно, в более низких дозах. Так, при введении СТЗ в дозах 40 мг/кг дважды, в комбинации с ВЖД в течение 7 недель, у мышей линии C57BL/6 также наблюдались вышеперечисленные метаболические нарушения, кроме того, адипонектин также был значительно повышен в сыворотке [154].

В случае применения СТЗ у животных обязательно необходимо проводить гистологический анализ поджелудочной железы. При введении стрептозоцина в вышеперечисленных дозах у крыс и мышей наблюдались нарушения формы и снижение числа островков, что характерно для развития СД1. Применение СТЗ больше описывает патофизиологию при развитии диабета 1 типа у крыс и мышей для изучения иммунного ответа в поджелудочной железе, поскольку многократные инъекции низких доз СТЗ могли вызывать постепенное аутоиммунное разрушение β -клеток. Поэтому достижение картины СД2 часто достигается путем комбинирования ВЖД и низких доз СТЗ. Так, Zhang и др. [155] изучили различные дозы и режимы СТЗ (25, 30, 35, 45 мг/кг, вводимые внутрибрюшинно) на фоне ВЖД у крыс, с целью найти наиболее схожие патофизиологические проявления, характерные именно для СД2. Инъекция СТЗ (45 мг/кг, внутрибрюшинно) после 4 недель ВЖД вызывала выраженную гипергликемию у всех крыс с инсулинозависимостью, что в большей степени напоминает СД1. Напротив, СТЗ в дозе 30 мг/кг и 35 мг/кг, не вызывал значительной гипергликемии у крыс на фоне ВЖД. Многократные низкие дозы

СТЗ (30 мг/кг внутривенно с недельным интервалом в течение 2 недель) вызывали выраженную гипергликемию и инсулинорезистентность у крыс, получавших ВЖД, но не вызывали гипергликемию у крыс на стандартной диете [155]. Таким образом, подтверждается необходимость применения диеты как экологического фактора для достижения инсулинорезистентности у животных при моделировании СД2.

В ряде недавних публикаций и обзоров в фокусе внимания находится применение ВЖД у животных при моделировании СД2. Этот фактор внешней среды демонстрирует сходство между мышинной моделью и людьми, страдающими СД2. Отмечается и полезность использования ВЖД для испытания лекарств для СД2. Heydemann указывает на развитие инсулинорезистентности и хронического воспаления у мышей при соблюдении только ВЖД, что прямо коррелирует с длительностью диеты [96]. Применение только ВЖД у крыс Wistar в течение 6 месяцев приводит к развитию преддиабета, что проявлялось в гипергликемии, нарушении липидного обмена и повышении уровня инсулина, нарушении транспорта GLUT-4. Достижение СД2 у крыс с помощью только ВЖД является сложной и высокочувствительной задачей [47].

У мышей линии C57BL/6J в связи с их генетическими особенностями имеется возможность сочетания генетического фактора вместе с экологическим фактором при моделировании СД2, что создает патогенез, свойственный клиническим случаям. Мыши C57BL/6J являются одной из наиболее широко используемых генетических линий в области исследований диабета. Эти мыши проявляют симптомы непереносимости глюкозы уже в возрасте 6 недель и очень восприимчивы к развитию ожирения, инсулинорезистентности и явного СД2 на фоне ВЖД. У мышей линии C57BL/6J обнаружен фенотип нарушенной секреции инсулина и клиренса глюкозы, тем самым подтвердив потерю функции гена никотинамид-нуклеотид-трансгидрогеназы, как источника непереносимости глюкозы. Считается, что отсутствие активности гена нуклеотид-трансгидрогеназы увеличивает воздействие митохондриального пероксида в β -клетках в ответ на поглощение и метаболизм глюкозы, тем самым снижая

соотношение АТФ (аденозинтрифосфат)/АДФ (аденозиндифосфат), задерживая закрытие АТФ-чувствительного калиевого канала и, в конечном итоге, ухудшая секрецию инсулина. Мутация потери функции в гене нуклеотид-трансгидрогеназы происходит исключительно от субштамма 6J, полученного в лаборатории The Jackson Laboratory. Другие субштаммы, такие как C57BL/6NTac и C57BL/6N, экспрессируют функциональный ген нуклеотид-трансгидрогеназы и проявляют лучшую толерантность к глюкозе, однако эти субштаммы демонстрируют ожирение, непереносимость глюкозы и резистентность к инсулину на фоне ВЖД [46]. Сообщается и о различиях в метаболическом ответе на ВЖД внутри одного субштамма 6J от разных производителей, что выражается в разнице набора веса у животных, проценте массы висцерального жира, ответе в глюкозотолерантном тесте [62]. Например, после применения ВЖД у мышей линии C57Bl/6J в течение 13 недель, наблюдалось развитие инсулинорезистентности и гиперлипидемии, гиперплазия клеток в островках Лангерганса [48]. Мыши линии C57BL/6J проявляли развитие хронического воспаления, развитие ожирения и инсулинорезистентности после 16-20 недель ВЖД [64].

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Объект исследования

Проводилось изучение эффективности пептидных ингибиторов α -амилаз, рекомбинантного Mgf в дозах 0,1 мг/кг, 0,01 мг/кг, 0,005 мг/кг, 0,0025 мг/кг и 0,001 мг/кг и рекомбинантного MgfII в дозах 0,01 мг/кг, 0,005 мг/кг, 0,001 мг/кг, 0,0005 мг/кг и 0,0001 мг/кг при пероральном способе введения.

В качестве носителя для Mgf и MgfII применялся натрий-фосфатный буфер (PBS). Сначала готовились стоковые растворы Mgf и MgfII концентрацией 1 мг/мл, и из них последовательным разведением получали необходимые растворы для введения. Концентрации пептидов 1 мг/мл хранились при -20°C до момента разведения в день введения, растворы необходимой концентрации готовились в день введения, и хранились при $+4^{\circ}\text{C}$.

2.2 Изучение эффективности Mgf и MgfII на модели гипергликемии при однократном пероральном введении

2.2.1 Животные

В эксперименте были использованы 130 самцов мышей ICR возрастом 7-8 недель, свободных видоспецифичных патогенов. Перед проведением эксперимента животные проходили период адаптации в течение 14 дней, во время которого находились в комнате содержания животных барьерного типа (по 5 особей в клетке площадью 845 кв. см). В адаптационный период проводился ежедневный осмотр животных для регистрации и исключения из эксперимента животных с отклонениями здоровья. Перед формированием групп проводился клинический осмотр. В 1 день эксперимента проводилось формирование групп. Животные распределялись по группам так, чтобы масса тела у животных между группами статистически не различалась. Каждому

животному был присвоен индивидуальный номер, в соответствии с которым животному ставилась цветная метка на шерсти.

Животных содержали в стандартных условиях вивария, определенные Директивой 2010/63/EU по защите животных, используемых в научных целях. В качестве приемлемых границ параметров микроклимата в комнатах содержания животных приняты границы, определенные руководством *The Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (National Academy Press, Washington D.C., 2011). Животные содержались в комнате содержания животных барьерной зоны в контролируемых условиях окружающей среды (температура воздуха 20-24°C, относительная влажность 30–70%, 12-часовой цикл освещения (08:00-20:00 – «день», 20:00-08:00 – «ночь») и, по крайней мере, 10-ти кратная смена объема воздуха комнаты в час). Температура и влажность постоянно контролировались в комнате содержания животных автоматически с помощью системы Eksis Visual Lab (EVL, ОАО «Практик-НЦ», Россия).

Во время эксперимента животные содержались по 5 особей в клетках площадью 845 кв. см на подстиле. В качестве подстила использовался автоклавированный беспылевой подстил для грызунов, представляющий собой древесную крошку (LIGNOCEL BK8/15, JRS, Германия).

Животным давался стандартный гранулированный корм для содержания лабораторных грызунов Mmucedola Standard Diet 4RF25 (автоклавируемый), *ad libitum*, в кормовое углубление крышки клетки. Специально подготовленная системой Milli-RO (Millipore, США) вода давалась *ad libitum* в стандартных автоклавированных питьевых бутылочках со стальными крышками-носиками.

2.2.2 Дизайн эксперимента

2.2.2.1 Моделирование гипергликемии

Гипергликемия индуцировалась у 130 самцов мышей ICR путем однократной внутрибрюшинной инъекции стрептозоцина (Merck, Китай) в дозе 150 мг/кг, объем введения 10 мл/кг. Стрептозотцин растворялся в холодном

0,1М цитратном буфере, pH=4,5, непосредственно перед введением. В день перед введением стрептозоцина у животных была измерена начальная концентрация глюкозы натощак (через 4 часа после лишения корма, со свободным доступом к воде). Развитие гипергликемии отслеживалось на 7 и 14 день исследования путем измерения концентрации глюкозы в крови натощак. Перед измерением концентрации глюкозы на 1, 7 и 14 дни исследования животных лишали корма на 4 часа. После введения СТЗ, у животных ежедневно проводился клинический осмотр и выявление случаев смертности. На 14 день исследования из эксперимента были исключены животные, у которых концентрация глюкозы в крови не достигла 15 ммоль/л. Также до 14 дня исследования было досрочно подвергнуто эвтаназии 2 животных, у которых потеря массы тела составляла более 20%. Таким образом, для проведения крахмального перорального теста на 14 день в каждую группу были включены по 7 животных.

2.2.2.2 Определение эффективных доз Mgf и MgfII

Эффективность Mgf и MgfII изучалась при проведении крахмального теста на экспериментальной модели гипергликемии у самцов мышей ICR. Животных взвешивали перед введением веществ на 1 и 14 дни исследования. Крахмальный тест проводился через 14 дней после введения стрептозоцина. В день проведения крахмального теста животные лишались корма на 4 часа до момента введения крахмала (с 9:00 до 13:00 часов). За 45 минут до перорального введения крахмала, животным в зависимости от групповой принадлежности (Таблица 1) перорально вводились носитель (Фосфатный буфер, Пущинские лаборатории, Россия), акарбоза в дозе 24 мг/кг (Merck, Китай), Mgf или MgfII в объеме 5 мл/кг в диапазоне доз. Доза акарбозы для перорального введения у мышей была рассчитана, исходя из суточной дозы для человека, составляющей 150 мг, с учетом коэффициента перерасчета площадей тела человека и мыши [126].

Таблица 1 – Дизайн эксперимента по поиску эффективных доз Mgf и MgfII на модели гипергликемии

Группа	Индукция гипергликемии	Введение препарата		
		Тестируемое вещество	Доза	Время введения до теста
1	0.1М цитратный буфер, рН 4.5, введение внутривентриально однократно 10 мл/кг	Носитель	-	45 мин
2	Стрептозоцин 150 мг/кг, введение внутривентриально однократно 10 мл/кг	Носитель		45 мин
3		Акарбоза	24 мг/кг	45 мин
4		Mgf	0,1 мг/кг	45 мин
5		Mgf	0,01 мг/кг	45 мин
6		Mgf	0,005 мг/кг	45 мин
7		Mgf	0,0025 мг/кг	45 мин
8		Mgf	0,001 мг/кг	45 мин
9		MgfII	0,01 мг/кг	45 мин
10		MgfII	0,005 мг/кг	45 мин
11		MgfII	0,001 мг/кг	45 мин
12		MgfII	0,0005 мг/кг	45 мин
13		MgfII	0,0001 мг/кг	45 мин

2.2.3. Манипуляции с животными

2.2.3.1 Глюкометрия

Процедура выполнялась для определения уровня глюкозы в крови - забирали каплю крови небольшим надрезом кончика хвоста и определяли концентрацию глюкозы глюкометром Сателлит®Экспресс (ЭЛТА, Россия).

2.2.3.2 Крахмальный тест

Крахмальный тест проводится на 14 день исследования. Кукурузный крахмал (ООО Гарнец, Россия) вводился перорально зондом в желудок в дозе 3 г/кг, объемом 5 мл/кг. Измерение концентрации глюкозы в крови проводилась натощак непосредственно перед введением крахмала, и каждые полчаса после введения крахмала (30, 60, 90 и 120 минут).

2.2.4 Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием программы GraphPad Prism 5. Перед проведением сравнения контрольных и опытных групп, выборки были проанализированы на нормальность распределения в тесте Shapiro-Wilk. Для установления межгрупповых различий применялся однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с post-hoc тестом Tukey. Результаты считали статистически значимыми при уровне доверительной вероятности $p < 0,05$.

2.3 Изучение эффективности Mgf и MgfII на модели экспериментального сахарного диабета 2 типа

В результате эксперимента на мышах ICR с индуцированной гипергликемией путем однократного введения СТЗ, соединением-лидером в эксперименте *in vivo* определен MgfII в дозах 0,005 мг/кг и 0,01 мг/кг при однократном введении перед глюкозотолерантным крахмальным тестом. В продолжении исследования эффективности MgfII использовалось его многократное введение на экспериментальной модели СД2. Для этого была экспериментально воспроизведена модель СД2 у мышей C57BL/6 путем соблюдения ВЖД в течение 18-21 недели. После достижения метаболических нарушений у мышей на 18 неделю, вводился MgfII в дозах 0,005 мг/кг и 0,01 мг/кг, в течение 4-х недель ежедневно перорально, в качестве препаратов сравнения с аналогичным пероральным режимом введения использовались метформин в дозе 200 мг/кг/сут и акарбоза в дозе 24 мг/кг/сут. Дозы метформина и акарбозы для перорального введения у мышей были рассчитаны, исходя из суточной дозы метформина для человека, составляющей 1000-1500 мг/сут, а также для акарбозы – 150 мг/сут, с учетом коэффициента перерасчета площадей тела человека и мыши [126].

2.3.1 Животные

Исследование по изучению эффективности MgflI на экспериментальной модели СД2 проводилось на 145 половозрелых самцах мышей C57BL/6 возрастом 5-6 недель массой 20-22 г, свободных видоспецифичных патогенов. Перед проведением эксперимента животные проходили период адаптации в течение 14 дней, во время которого находились в комнате содержания животных барьерного типа (по 5 особей в клетке площадью 845 кв. см). В адаптационный период проводился ежедневный осмотр животных для регистрации и исключения из эксперимента животных, с отклонениями здоровья. Перед формированием групп проводился клинический осмотр. В 1 день эксперимента проводилось формирование групп. Животные распределялись по группам так, чтобы масса тела у животных между группами статистически не различалась. Каждому животному был присвоен индивидуальный номер, в соответствии с которым животному ставилась метка проколом ушной раковины.

За стандарты содержания животных приняты стандарты, определенные Директивой 2010/63/EU по защите животных, используемых в научных целях. В качестве приемлемых границ параметров микроклимата в комнатах содержания животных приняты границы, определенные руководством The Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press, Washington D.C., 2011).

Животные содержались в комнате содержания животных барьерной зоны в контролируемых условиях окружающей среды (температура 20-24°C, относительная влажность 30–70%, 12-часовой цикл освещения (08:00-20:00 – «день», 20:00-08:00 – «ночь») и, по крайней мере, 10-ти кратная смена объема воздуха комнаты в час). Температура и влажность постоянно контролировались в каждой комнате содержания животных автоматически с помощью системы Eksis Visual Lab (EVL, ОАО «Практик-НЦ», Россия).

Животные содержались по 1 особи в клетках площадью 370 кв. см на автоклавированном подстиле. Фильтрованная системой Milli-RO (Millipore) вода давалась *ad libitum*.

2.3.1.1 Стандартная диета

Животным контрольной группы на стандартной диете давался стандартный гранулированный корм для содержания лабораторных грызунов Velaz FORTI 1324 Maintenance Diet (Altromin Spezialfutter GmbH & Co KG, Im Seelenkamp 20, D-32791 Lage, Германия) (автоклавируемый) давался ad libitum в кормовое углубление крышки клетки.

2.3.1.2 Высокожировая диета

Животным из групп с моделированием экспериментального СД2 готовился высокожировой корм на основе стандартного гранулированного корма. Высокожировой корм давался животным в течение 21 недели, начиная с 1 дня эксперимента после периода адаптации. Для приготовления 1 кг высокожирового корма использовалось 700 г перемолотого корма Velaz FORTI 1324 Maintenance Diet (Altromin Spezialfutter GmbH & Co KG, Im Seelenkamp 20, D-32791 Lage, Германия), 300 г свиного растопленного лярда (ЯНЬКОВЪ, Россия), подготовленная системой Milli-RO (Millipore, США) вода (350 мл) с добавлением 10 г пищевой соли (ОАО «Мозырьсоль», Беларусь) и 28,5 г глутамата натрия (Баба Клава, Россия). Формировались пищевые гранулы, которые подсушивались при температуре 50-60°C в течение 10-12 часов. Корм хранился в холодильнике при 4°C не более недели. Содержание жиров в рационе ВЖД было рассчитано, исходя из определенной производителем мышей C57BL/6J (Jackson Laboratory), использованных в данном исследовании, процента энергии, которую животные должны получить из жиров для достижения диет-индуцированного ожирения, что составляет 60% калорий [80].

2.3.2 Дизайн эксперимента

2.3.2.1 Моделирование экспериментального сахарного диабета 2 типа

Животным контрольной группы давалась стандартная диета (СТД). Животным экспериментальных групп давался высокожировой корм в течение 21 недели. Для контроля развития метаболических нарушений, начиная со 2 недели диеты и далее еженедельно, у всех животных измерялся уровень глюкозы из цельного образца венозной крови. Взвешивание животных проводилось каждую неделю.

2.3.2.2 Изучение эффективности MgfII на экспериментальной модели сахарного диабета 2 типа

На 18 неделю проводилось повторное формирование групп, основываясь на массе тела животных. Из эксперимента были исключены животные на ВЖД, которые не достигли массы тела, равной 28 г. Таким образом, в эксперимент были включены по 18 животных для групп на ВЖД. Контрольная группа также состояла из 18 животных.

Начиная с 18-й недели эксперимента животным ежедневно вводились дистиллированная вода, метформин (ООО НПО «ФармВИЛАР», Россия) в дозе 200 мг/кг, акарбоза (Merck, Китай) в дозе 24 мг/кг или MgfII в дозах 0,01 мг/кг и 0,005 мг/кг в зависимости от групповой принадлежности в течение 4-х недель (Таблица 2). Носитель (Фосфатный буфер, Пущинские лаборатории, Россия) вводился перорально группам № 1 и 2, в объеме 5 мл/кг. Метформин вводился перорально в дозе 200 мг/кг, в объеме 5 мл/кг. Акарбоза также вводилась перорально, в дозе 24 мг/кг, в объеме 5 мл/кг. MgfII вводился перорально в дозах 0,005 мг/кг и 0,01 мг/кг, в объеме 5 мл/кг.

В период введения тестируемых веществ у животных еженедельно измерялось потребление корма и проводилось взвешивание.

Крахмальный тест и анализ мочи, инсулинорезистентный тест и функциональные тесты: локомоторная активность, сила хватания, ацетоновый тест (холодовая чувствительность), Фон-фрей (механическая чувствительность), Hot Plate (чувствительность к нагреванию) проводились на 17, 19 и 21 неделю исследования.

На 17, 19 и 21 неделю исследования по 6 животных из каждой группы подвергали плановой эвтаназии. Перед эвтаназией животных анестезировали смесью Телазол100® (Зоэтикс, Испания)/Ксила® (Interchemie werken "De Adelaar" BV, Нидерланды) внутримышечно, до достижения хирургической стадии анестезии. Проводился терминальный забор крови из нижней полой вены для биохимического анализа, взвешивание и коллекция органов и тканей.

Таблица 2 – Группы и дозы животных в эксперименте по изучению эффективности MgII на экспериментальной модели СД2

№	Группа	Диета	Тестируемые вещества	Доза
1	Контроль	СТД	Носитель	-
2	СД2	ВЖД	Носитель	-
3	Метформин 200 мг/кг	ВЖД	Метформин	200 мг/кг
4	Акарбоза 24 мг/кг	ВЖД	Акарбоза	24 мг/кг
5	MgII 0,005 мг/кг	ВЖД	MgII	0,005 мг/кг
6	MgII 0,01 мг/кг	ВЖД	MgII	0,01 мг/кг

2.3.3 Манипуляции с животными

Методы глюкометрии и крахмального теста описаны выше в пунктах «2.2.3.1 Глюкометрия» и «2.2.3.2 Крахмальный тест».

2.3.3.1 Инсулинорезистентный тест

Перед проведением инсулинорезистентного теста животные лишались корма на 4 часа. Тестирование проводилось во второй половине дня. Инсулин Апидра® (Sanofi-Aventis Deutschland GMBH, Германия) вводился подкожно в

дозе 0,75 МЕ/кг, объемом 5 мл/кг. Измерение глюкозы в образце крови из сосудов хвоста проводили через 0, 15, 30, 60 и 120 минут после введения инсулина.

2.3.3.2 Регистрация локомоторной и исследовательской активности

Регистрацию параметров общей локомоторной активности и исследовательской активности проводили в первой половине дня. Измерения выполнялись с помощью компьютерной установки OPTO-VARIMEX с программой Auto-Trek Version 4.2 (Columbus Instruments, США). При нахождении животного на открытой площадке актометра измеряли вертикальную активность и горизонтальную активность.

2.3.3.3 Регистрация мышечной силы в тесте хватания Grip Strength

Оценка мышечной силы хватания проводилась на приборе GRIP STRENGTH METER (Columbus Instruments, США). Животное помещалось над решеткой, подсоединенной к динамометру. Животному давали зацепиться передними, и затем задними лапами за решетку трижды, вследствие чего отображалась максимальная сила натяжения динамометра. Измерения выполняли после регистрации локомоторной и исследовательской активности.

2.3.3.4 Изучение чувствительности к холоду

Ацетон (Ясхим, Россия) наносили в объеме до 100 мкл на подошву задней конечности животных. Длительность реакций на охлаждение оценивалась в секундах. Количество реакций оценивалось по общей сумме облизываний и потряхиваний лапы.

2.3.3.5 Изучение чувствительности к механическому стимулу

Механическая аллодиния по методу фон Фрея оценивалась электронным способом на приборе BIO-EVF (Bioseb, США). Так как прибор электронным способом регистрирует давление с помощью плетизмографа, использовался один наконечник. Перед оценкой чувствительности животному давали адаптироваться на мелкой решетке в течение 5 минут. Далее, когда животное спокойно располагало задние лапы на решетке, к подошвам обеих лап поочередно подносился наконечник прибора и производилось надавливание. При увеличении силы давления животное отдергивало лапу, и на приборе отображалась сила давления. Для увеличения точности измерения надавливание повторялось 3 раза.

2.3.3.6 Изучение чувствительности к нагреванию

Тест выполняли с помощью прибора Hot-Plate analgesia meter (Columbus Instruments, США). Для проведения теста животное помещали в камеру на нагретую площадку прибора (с температурой $50 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ и размером $25,3 \times 25,3$ см) и регистрировали латентное время облизывания передней лапы, отдергивания задней лапы и первый прыжок. После прыжка животное извлекалось из прибора и тестирование оканчивалось.

2.3.3.7 Диурез

За день перед крахмальным тестом животных помещали в метаболические клетки (Tecniplast, США) на ночь, на период 19-22 часов для регистрации спонтанного диуреза и сбора мочи. При нахождении в метаболической клетке корм животным не давался, предоставлялся свободный доступ к воде. Объем выделенной мочи замеряли на следующий день для определения суточного диуреза.

2.3.3.8 Офтальмоскопия

Офтальмоскопия проводилась на 17 неделю эксперимента с помощью реп-
scope® Riester (Германия).

2.3.3.9 Забор крови

Животных анестезировали смесью Телазол100® (Зоэтис, Испания) / Ксила® (Interchemie werken "De Adelaar" BV, Нидерланды), внутримышечно, для достижения хирургической стадии анестезии. Образец крови забирался из нижней поллой вены. Кровь помещали в пробирку и давали свернуться в течение 40-60 минут. После свертывания крови, пробы центрифугировали в течение 15 минут при +4°C для получения сыворотки. Для последующего биохимического анализа сыворотку замораживали и хранили при -20°C до момента измерения. Для иммуноферментного анализа сыворотку замораживали и хранили при -70°C до момента измерения.

2.3.3.10 Биохимический анализ

В сыворотке крови определяли показатели: аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспаратаминотрансфераза (АСТ), креатинин, щелочная фосфатаза (ЩФ), мочевины, триглицериды, билирубин общий, неэтерифицированные жирные кислоты (НЭЖК), липопротеины высокой плотности (ЛПВП), холестерин. Измерения проводили на автоматическом биохимическом анализаторе Sapphire-400 (Токуо Воэки LTD, Япония) с использованием соответствующих для каждого параметра наборов реагентов Randox GB.

2.3.3.11 Иммуноферментный анализ сыворотки

В сыворотке крови иммуноферментным методом определяли показатели: HbA1c, инсулин при помощи коммерческих наборов для мышей Cloud-Clone

Corp (БелкиАнтитела, Россия). Измерения проводили с использованием и спектрофотометра Multiskan™ GO (Termo Scientific).

2.3.3.12 Общий анализ мочи

Общий анализ мочи выполняли полуколичественно и качественно с помощью стрип-теста полосками Pocketchem Aution Sticks 10 EA (ARKRAY Factory, Inc., Япония) по следующим показателям: Глюкоза, мг/дл, Удельный вес, Общий белок, мг/дл, Кровь, мг/дл, pH Билирубин, мг/дл, Кетоны, мг/дл, Уробилиноген, мг/дл, Нитриты, качественно, Лейкоциты, кл/мкл.

2.3.3.13 Масса органов

У всех животных при некропии взвешивали сердце, печень, селезенка, семенники, почки и жировую ткань, окружающую придатки семенников. Почки и семенники взвешивали вместе. Масса тела животного, зарегистрированного перед некропсией, использовалась для расчета относительной массы взвешенных органов.

2.3.3.14 Коллекция органов

Почки, сердце, аорта, печень, поджелудочная железа и жировая ткань, окружающая придатки семенников, были помещены в 10% формалин. Ткани собранных органов заливались в парафин и резались на срезы, окрашивались гематоксилином. Полученные срезы были изучены с помощью световой микроскопии на микроскопе DMLA Leica (Германия). Микрофотографии гистологических препаратов получали с помощью камеры высокого разрешения AxioCam 305 color (Carl Zeiss, Германия) и программного обеспечения ZEN 2.6 lite (Carl Zeiss, Германия).

2.3.3.15 Подсчет диаметра адипоцитов

На срезах висцерального жира производили измерение размеров 100 адипоцитов в 15–20 случайных полях зрения. Измерение проводилось с помощью программного обеспечения ImageJ (США).

Глава 3. Результаты

3.1 Эффективность ингибиторов α -амилаз на экспериментальной модели гипергликемии

Гипергликемия достигалась путем введения стрептозоцина (СТЗ), β -клеточного токсина, самцам мышей ICR. У животных, которым вводился стрептозоцин, наблюдалось повышение концентрации глюкозы в крови натошак на 7 день исследования до 16,6 ммоль/л, по сравнению с концентрацией глюкозы до введения СТЗ, составляющей 6,9 ммоль/л в среднем (Рисунок 6). На 14 день после введения СТЗ, у животных наблюдалось значительное повышение концентрации глюкозы в среднем до 19,6 ммоль/л.

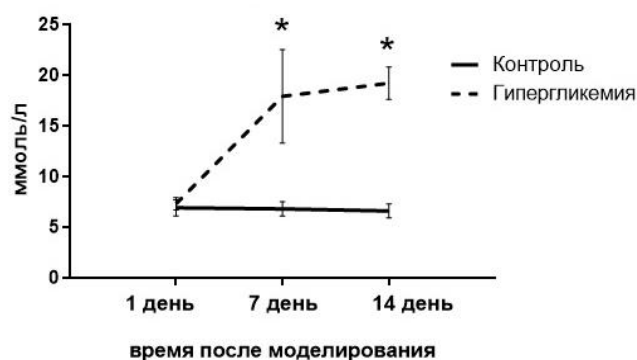


Рисунок 6 – Концентрация глюкозы при моделировании гипергликемии после введения СТЗ, ммоль/л.

Примечание – результаты представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ относительно контрольной группы (t-тест Стьюдента).

Через 14 дней после введения стрептозотоцина, из эксперимента были исключены 30% животных, у которых концентрация глюкозы в крови натошак не достигла 15 ммоль/л. Оставшиеся животные были распределены на экспериментальные группы так, чтобы концентрация глюкозы в крови статистически не различалась между группами.

Животные были лишены корма на 4 часа перед началом крахмального теста. Во время крахмального теста у животных гипергликемической группы наблюдалось повышение абсолютного значения концентрации глюкозы в

течение 2 часов после введения крахмала (Таблица 3). Введение препарата сравнения акарбозы в дозе 24 мг/кг проявило эффективность в снижении постпрандиальной концентрации глюкозы (Рисунок 7).

Животные, которым вводился Mgf в дозе 0,005 мг/кг перорально за 45 минут до крахмального теста, показали снижение абсолютного значения концентрации глюкозы через 90 и 120 минут после введения крахмала по сравнению с гипергликемическими животными. MgfII, вводимый в дозе 0,01 мг/кг за 45 минут до крахмального теста, снижал постпрандиальный уровень глюкозы с 30 минуты крахмального теста. При введении MgfII в дозе 0,01 мг/кг за 45 минут до крахмального теста, постпрандиальная концентрация глюкозы в течение 2 часов проведения теста была значительно ниже, чем у животных с введением носителя и индуцированной гипергликемией. MgfII в дозе 0,005 мг/кг, который вводился за 45 минут до начала крахмального теста, снизил концентрацию глюкозы на 30 и 90 минутах по сравнению гипергликемическими животными, и не привел к повышению уровня глюкозы после введения крахмала относительно начального уровня глюкозы.

Таблица 3 – Абсолютные значения концентрации глюкозы в крахмальном тесте, ммоль/л

Группа (препарат, доза, время введения до теста)	До введения крахмала	30 минут	60 минут	90 минут	120 минут
1 – контроль	6,6±0,7	7,7±0,8	7,8±1,3	7,4±0,7	7±0,7
2 – гипергликемия	19,2±1,6	23,8±1,8	24,1±2,9	24±2,3	23,2±3
3 – Mgf 0,1 мг/кг, 45 минут	18,4±2,8	22,1±3,3	21,6±2,7	21,2±2,7	20,5±2,8
4 – Mgf 0,01 мг/кг, 45 минут	21±3,2	24,1±3	23,6±3	23,8±2,7	23,6±2,9
5 – Mgf 0,005 мг/кг, 45 минут	19,2±3,9	21,2±3,2	21,5±3,4	20,4±3,6 [#]	19,6±3,4 [#]
6 – Mgf 0,0025 мг/кг, 45 минут	21,8±2,5	24,7±2,1	24,7±1,8	24,4±2,4	23,2±3,4
7 – Mgf 0,001 мг/кг, 45 минут	21,1±2,3	23,9±2,4	25,1±2,9	24,5±3	23,7±2,3
8 – MgfII 0,01 мг/кг, 45 минут	20±2,1	20,7±1,2 [#]	20,6±1,5 [#]	20,1±2 [#]	17,3±5,2 [#]
9 – MgfII 0,005 мг/кг, 45 минут	19,1±2,8	18,9±4,5 [#]	18,5±5,9	18,9±5,3 [#]	18±5,3
10 – MgfII 0,001 мг/кг, 45 минут	19±1,9	21,5±3,9	25±2,6 [#]	23,6±3,5 [#]	22,7±4,1 [#]
11 – MgfII 0,0005 мг/кг, 45 минут	20,2±1,7	23±2,5 [#]	23,5±3,4 [#]	23,1±3,8 [#]	21,9±4,4
12 – MgfII 0,0001 мг/кг, 45 минут	20,4±1,5	24,9±1	26,2±1,5 [#]	25,9±0,9 [#]	22,2±3,2

Примечание – результаты представлены как средние значения ± стандартное отклонение. [#]p<0,05 относительно группы гипергликемии согласно t-тесту Стьюдента.

На рисунке 7 представлены концентрации глюкозы в крови при проведении крахмального теста с эффективными дозами исследуемых пептидов.

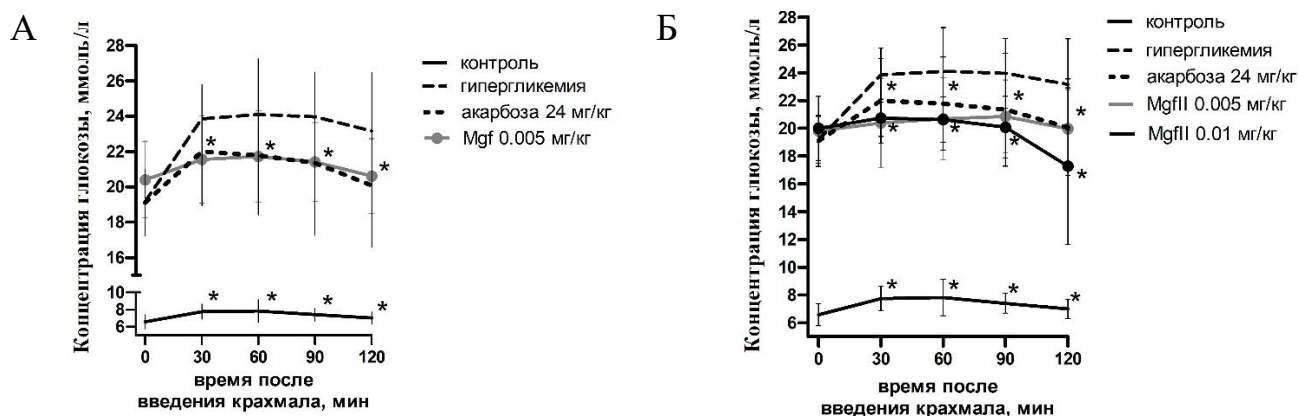
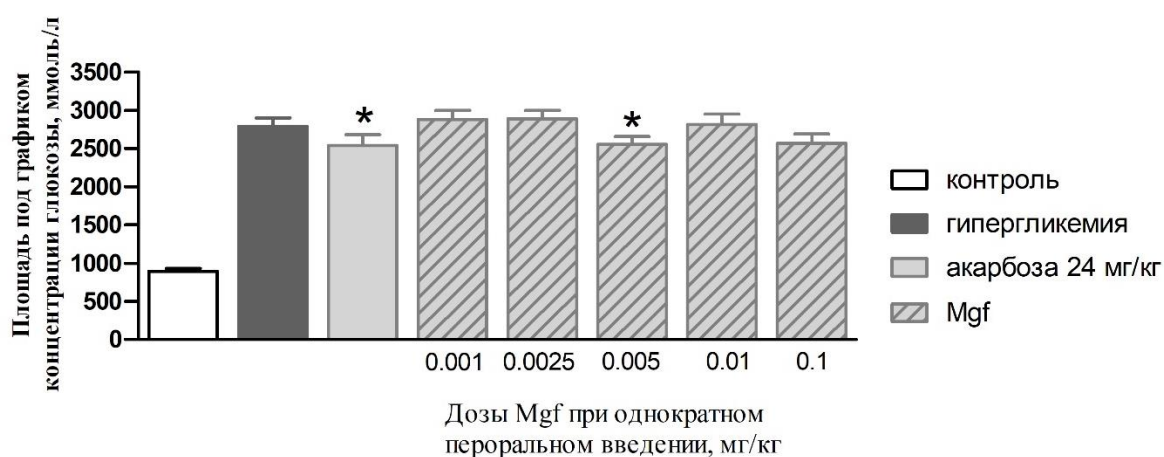


Рисунок 7 – Концентрация глюкозы в крахмальном тесте, ммоль/л. Тестируемые вещества вводились за 45 минут до начала теста. Введение эффективной дозы Mgf (А) и введение эффективных доз MgfII (Б).

Примечание – результаты представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего. *p<0,05 относительно группы гипергликемии (t-тест Стьюдента).

Исходя из абсолютных значений концентрации глюкозы в крахмальном тесте на 0, 30, 60, 90 и 120 минуту, подсчитывались площади под графиками концентрации глюкозы (Рисунок 8). Обнаружено, что акарбоза, и дозы Mgf и MgfII, снижавшие постпрандиальный уровень глюкозы в крахмальном тесте, аналогично снижают площадь под графиком концентрации глюкозы относительно гипергликемических животных. Однако, Mgf проявляет эффективность в дозе 0,005 мг/кг, но при исследовании более низких доз не проявляет антигипергликемической активности. В то же время, MgfII проявляет антигипергликемическую активность в дозах 0,005 мг/кг и 0,01 мг/кг. Также стоит отметить, что MgfII в дозе 0,01 мг/кг проявляет большую активность в снижении постпрандиального уровня глюкозы, чем акарбоза, в то время как Mgf в дозе 0,005 мг/кг проявляет активность сопоставимо с акарбозой (Рисунок 7).

А



Б

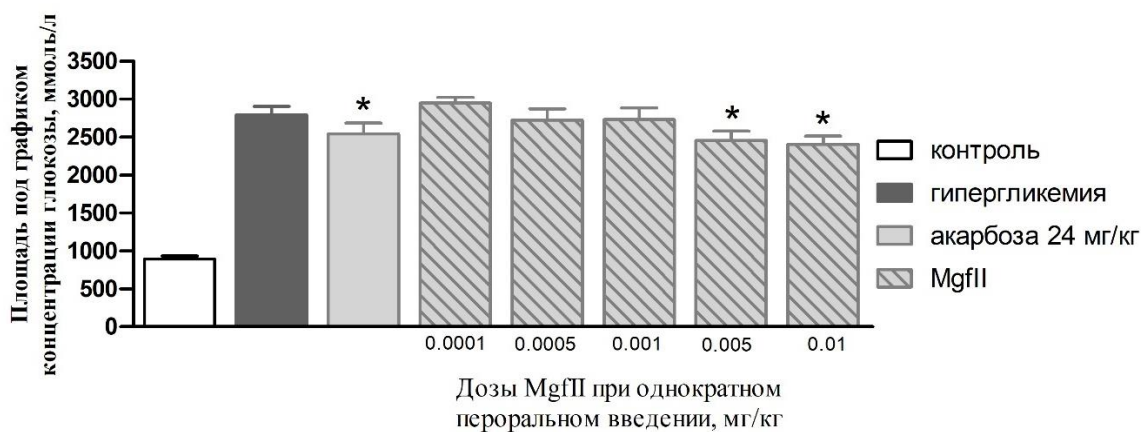


Рисунок 8 – Площадь под графиком (AUC) концентрации глюкозы при проведении крахмального теста, ммоль/л. Тестируемые вещества вводились за 45 минут до начала теста – перорального введения крахмала. Исследуемые дозы Mgf (А) и исследуемые дозы MgfII (Б).

Примечание – результаты представлены как средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. * $p < 0,05$ относительно группы гипергликемии (t-тест Стьюдента).

Таким образом, соединением-лидером стал MgfII в дозах 0,01 мг/кг и 0,005 мг/кг. Эффективная доза Mgf при однократном пероральном введении составила 0,005 мг/кг, однако при повышении или понижении дозы гипогликемическая активность Mgf снижается, в отличие от MgfII (Рисунок 7). Поэтому дальнейшее исследование эффективности проводилось для пептида MgfII в дозах 0,005 мг/кг

и 0,01 мг/кг при его 4-х недельном пероральном введении на экспериментальной модели СД2.

3.2 Моделирование экспериментального сахарного диабета 2 типа

Для изучения эффективности MgfII была воспроизведена экспериментальная модель СД2. На втором этапе использовались мыши C57BL/6J, которые содержались на высокожировой диете в течение 21 недели. Введение MgfII и препаратов сравнения начиналось с 18 недели исследования. В процессе моделирования у животных еженедельно отслеживалась масса тела и уровень глюкозы натощак. На протяжении всего эксперимента гибели животных не наблюдали.

В начале исследования средняя масса тела животных во всех группах была одинаковой. Начиная с 14 недели нахождения животных на высокожировой диете (группа СД2), наблюдалось значительное увеличение прироста массы тела по сравнению с животными на стандартной диете группы контроль (Рисунок 9). При содержании животных на ВЖД наблюдалось достоверное увеличение массы тела: к концу 17-й недели масса тела составляла в среднем 31 г.

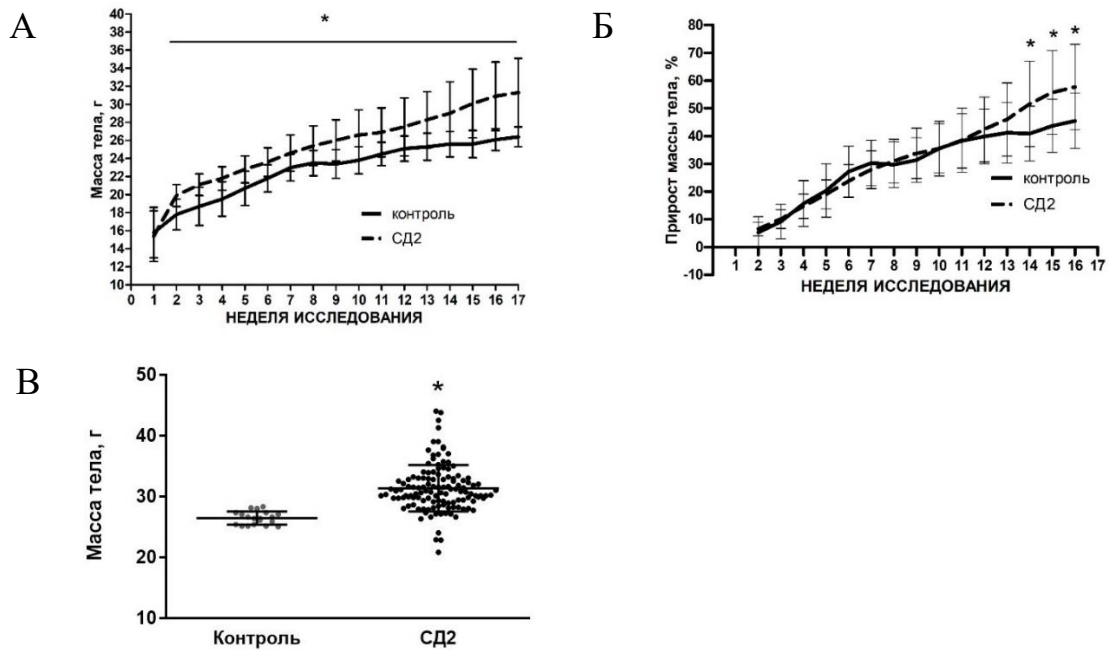


Рисунок 9 – Масса тела (А) и прирост массы тела (Б) в период моделирования сахарного диабета 2 типа; масса тела на 17 неделю исследования (В).

Примечание – результаты представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ относительно контрольной группы (t-тест Стьюдента).

Повышение концентрации глюкозы натощак в крови у животных группы СД2 наблюдалось уже со 2 до 21 недели исследования, и составляло на 2 неделю исследования в среднем 10 ммоль/л. На 17 неделю, перед введением тестируемых веществ, среднее значение уровня глюкозы у животных натощак составляло в среднем 12 ммоль/л (Рисунок 10).

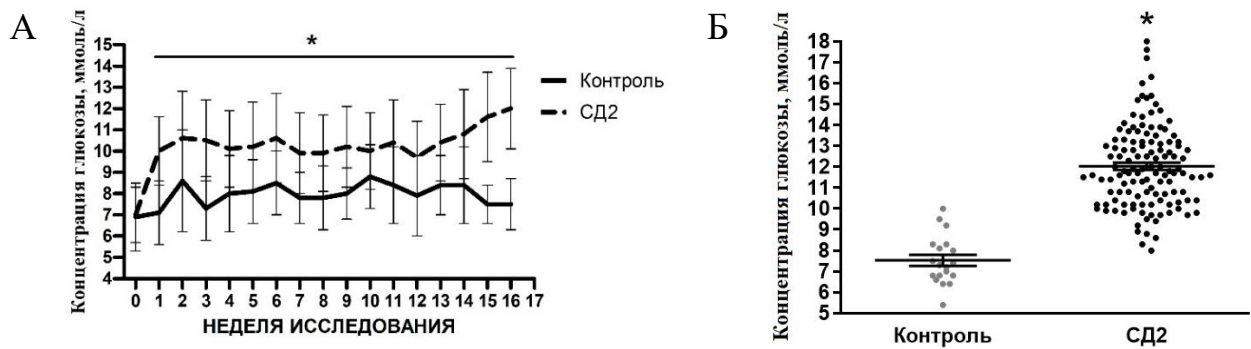


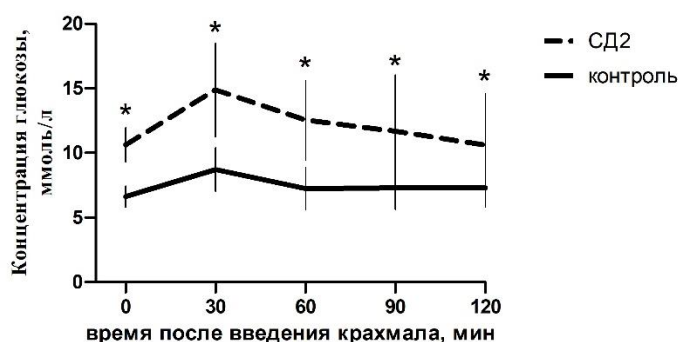
Рисунок 10 – Концентрация глюкозы в крови в период моделирования СД2 (А) и концентрация глюкозы в крови на 17 неделю моделирования сахарного диабета 2 типа (Б).

Примечание – результаты представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ относительно контрольной группы (t-тест Стьюдента).

На 17 неделю исследования из групп, находящихся на ВЖД, были исключены животные с массой тела менее 27 г. Далее в эксперименте участвовали по 22 животных в группах на ВЖД (Таблица 1).

Животные на ВЖД демонстрировали повышение не только тощакового уровня глюкозы, но и постпрандиального уровня глюкозы. После введения крахмала животным группы СД2 пиковое значение глюкозы было более выражено по сравнению с контрольной группой. Аналогично, площадь под графиком концентрации глюкозы при проведении крахмального теста была значительно выше в группе СД2 на 17 неделю ВЖД по сравнению с контролем (Рисунок 11).

А



Б

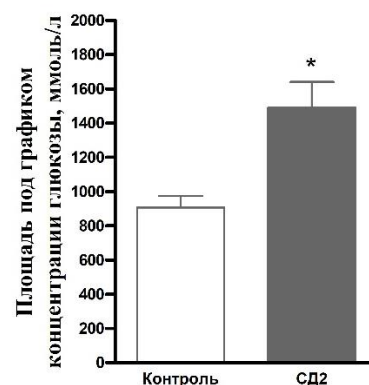
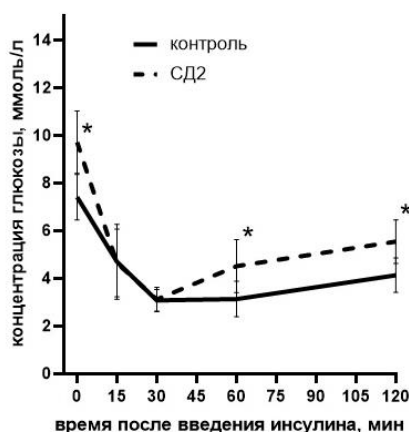


Рисунок 11 – Крахмальный тест у животных на 17 неделю моделирования экспериментального СД2. Абсолютные значения концентрации глюкозы в крови после введения крахмала (А); площадь под графиком концентрации глюкозы при проведении крахмального теста (Б).

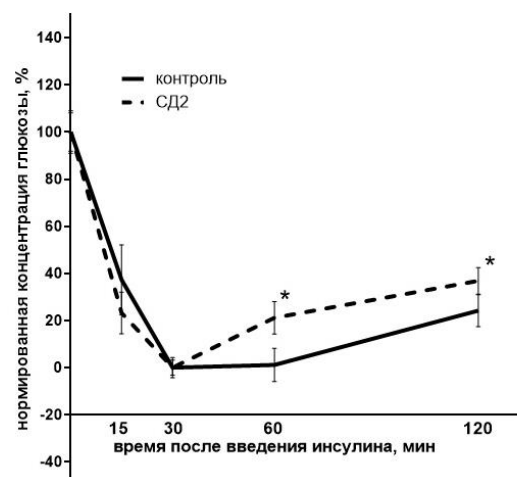
Примечание – * $p < 0,05$ относительно контрольной группы (тест Mann-Whitney).

При соблюдении ВЖД в течение 17 недель, животные демонстрировали снижение чувствительности к инсулину. При введении инсулина, концентрация глюкозы в крови восстанавливалась более выражено у животных на ВЖД, начиная с 60 минуты теста, чем в контрольной группе. Однако площадь под кривой концентрации глюкозы при проведении инсулинорезистентного теста не отличалась контрольной группы (Рисунок 12). Таким образом, у животных на 17 неделю ВЖД намечается тенденция к снижению чувствительности к инсулину: по нормированным значениям концентрации глюкозы заметно более выраженное повышение ее концентрации через 60 и 120 минут после введения инсулина по сравнению с контролем.

А



Б



В

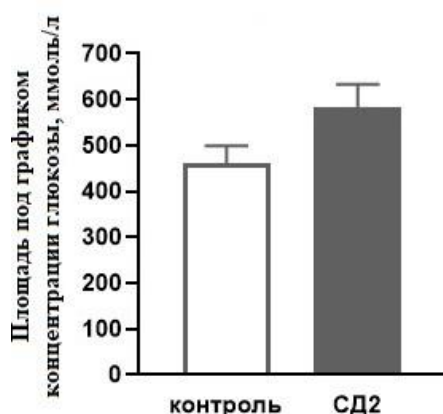


Рисунок 12 – Инсулинорезистентный тест у животных на 17 неделю исследования, в группе СД2 применение ВЖД в течение 17 недель. Абсолютные значения концентрации глюкозы после введения инсулина (А); нормированные значения концентрации глюкозы после введения инсулина (Б); площадь под графиком (AUC) абсолютных значений концентрации глюкозы после введения инсулина (В).

Примечание – * $p < 0,05$ относительно контрольной группы согласно тесту Mann-Whitney.

Итак, на 17 неделю ВЖД у мышей наблюдались признаки метаболических и физиологических нарушений, характерных для развития СД2: гипергликемия при измерении тощакового и постпрандиального уровня глюкозы, увеличение массы тела и прироста массы тела, тенденция к развитию инсулинорезистентности. В связи с такими результатами, было решено начать введение тестируемых веществ на фоне моделирования экспериментального СД2 с 18 недели ВЖД.

3.3 Эффективность MgfII на экспериментальной модели сахарного диабета 2 типа

Для исследования эффективности MgfII, при достижении метаболических нарушений на 18 неделю животные, содержащиеся на ВЖД, были повторно разделены на четыре экспериментальные группы: с введением MgfII в дозах 0,005 мг/кг и 0,01 мг/кг, а также препаратов сравнения. В качестве одного препарата сравнения использовалась акарбоза, ингибитор α -амилаз, лекарственный препарат с механизмом действия, аналогичным MgfII. Вторым препаратом сравнения был выбран метформин, представляющий собой противодиабетический препарат, способный контролировать глюконеогенез и чувствительность тканей к инсулину. Препараты сравнения имеют разные механизмы действия, но относятся к пероральным антигипергликемическим препаратам, которые применяются на регулярной основе при СД2. Таким образом, на фоне развития экспериментального СД2, животным с 18 недели перорально ежедневно вводились MgfII, метформин или акарбоза в течение 4-х недель.

3.3.1 Влияние MgfII на прирост массы тела

Метформин в дозе 200 мг/кг, и MgfII в дозе 0,01 мг/кг при ежедневном пероральном введении значительно снижали массу тела животных на 4 неделе введения. У животных группы контроля и СД2 наблюдался положительный прирост массы тела в период с 18 по 21 неделю исследования, с увеличением прироста массы тела в группе СД2 (Рисунок 13). Все тестируемые вещества при ежедневном пероральном введении демонстрировали отрицательный прирост массы тела как через 2, так и через 4 недели. Прирост массы тела был значительно снижен у группы с введением метформина в дозе 200 мг/кг как по сравнению с диабетическими животными, так и контрольными. Введение акарбозы и MgfII в обеих дозах привело к значительному снижению прироста

массы тела относительно группы СД2, в то же время прирост массы тела был сопоставим с контрольными значениями.

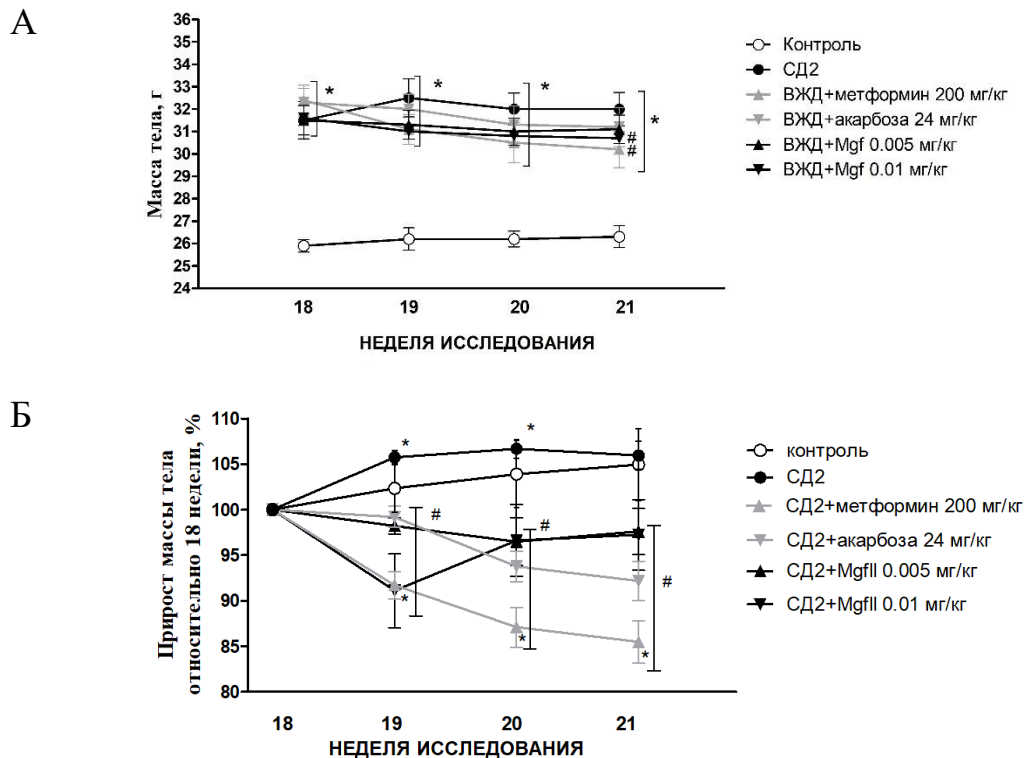


Рисунок 13 – Масса тела в период введения тестируемых веществ (А) и относительный прирост массы тела в сравнении с 18 неделей эксперимента (Б).

Примечание – данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ относительно контрольной группы (тест Mann-Whitney); # $p < 0,05$ относительно группы СД2 (тест Mann-Whitney).

3.3.2 Влияние MgII на потребление корма

Потребление корма было значительно снижено у всех групп, которым в течение недели вводились тестируемые вещества, относительно групп контроль и СД2. Через 2, 3 и 4 недели введения тестируемых веществ замечено повышение потребления корма у групп с введением тестируемых веществ относительно первой недели, однако во всех группах на ВЖД потребление корма остается сниженным по сравнению со стандартной диетой. Однако если рассмотреть перерасчет потребления корма в энергетическую ценность, то группы животных на ВЖД потребляли такое же количество калорий, что и

животные на стандартной диете, за исключением метформина через одну неделю введения (Рисунок 14).

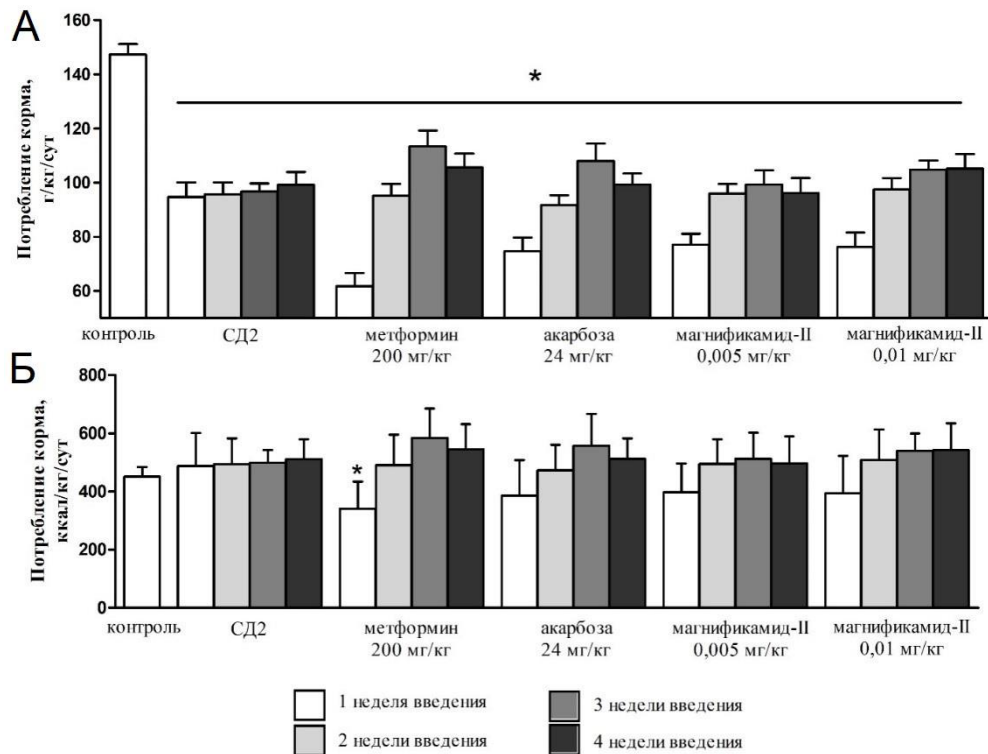


Рисунок 14 – Потребление корма в период введения тестируемых веществ (А) г/кг/сут, (Б) ккал/кг/сут.

Примечание – данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ относительно контрольной группы (тест Mann-Whitney).

3.3.3 Антигипергликемические свойства MgII

Гипергликемия наблюдалась во всех группах животных на ВЖД. Пероральное введение в течение 2 и 4 недель метформина, акарбозы и MgII в дозах 0,005 мг/кг и 0,01 мг/кг значительно снижало концентрацию глюкозы в крови натощак, но концентрация глюкозы в крови не достигала контрольных значений на фоне применения тестируемых веществ (Рисунок 15).

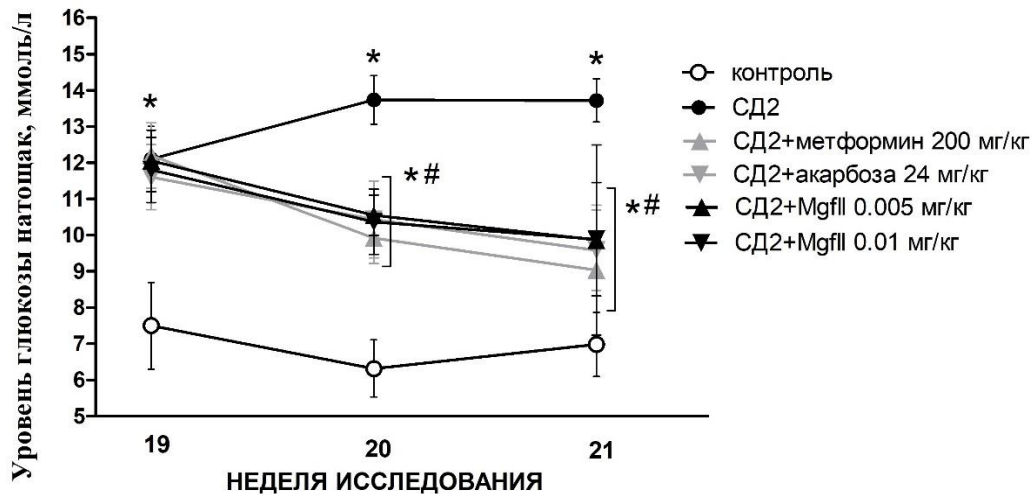
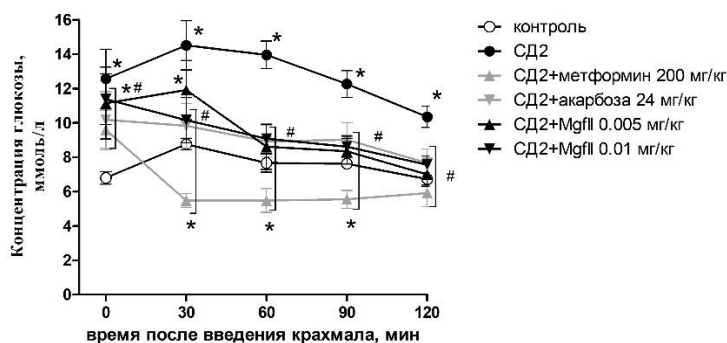


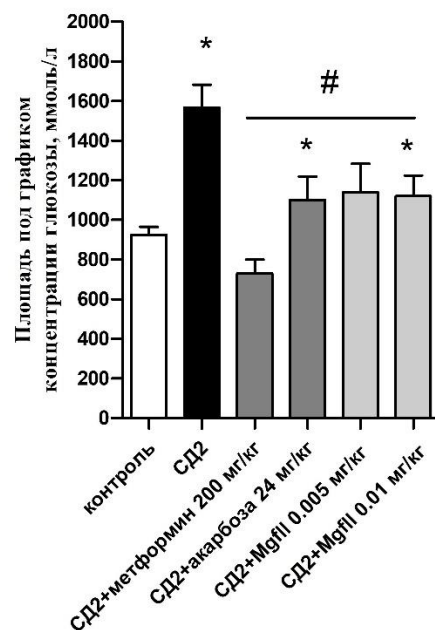
Рисунок 15 – Уровень глюкозы натощак в период введения тестируемых веществ. Примечание – данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ относительно контрольной группы (тест Mann-Whitney); # $p < 0,05$ относительно группы СД2 (тест Mann-Whitney).

Крахмальный тест проводился на 19 и 21 неделю эксперимента, через 2 и 4 недели введения тестируемых веществ. В день крахмального теста метформин, акарбоза и MgII вводились за 45 минут до начала тестирования. В группе прослеживалось СД2 значительное повышение постпрандиального уровня глюкозы и общей площади под графиком концентрации глюкозы на 19 и 21 неделю ВЖД (Рисунок 16). В то время как препараты сравнения метформин и акарбоза демонстрировали значительное снижение пиковой концентрации глюкозы через 2 и 4 недели их введения. MgII в дозах 0,005 мг/кг и 0,01 мг/кг проявил антигипергликемический эффект наравне с акарбозой. На основании полученных результатов можно заключить, что MgII снижает концентрацию глюкозы в крови не только постпрандиально, но и натощак, при многократном пероральном введении.

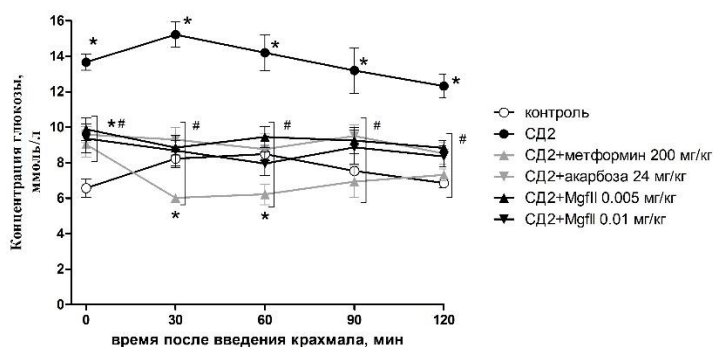
А



Б



В



Г

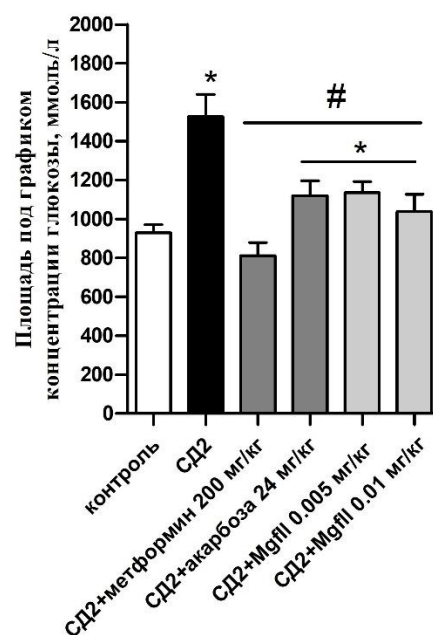


Рисунок 16 – Крахмальный тест. Абсолютные значения концентрации глюкозы в крови после введения крахмала на 19 неделю (А) и 21 неделю (В) исследования. Общая площадь под графиком концентрации глюкозы при проведении крахмального теста на 19 неделю (Б) и 21 неделю (Г) исследования. Примечание – данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ относительно контрольной группы (тест Mann-Whitney); # $p < 0,05$ относительно группы СД2 (тест Mann-Whitney).

3.3.4 Влияние MgfII на инсулинорезистентность

Инсулинорезистентный тест проводился на 19 и 21 неделю эксперимента, когда введение тестируемых веществ происходило в течение 2 и 4 недель. ВЖД в течение 19 недель и 21 недели привело к более выраженному повышению концентрации глюкозы после введения инсулина по сравнению с контрольной группой (Рисунок 17). Площадь под графиком концентрации глюкозы после введения инсулина была значительно выше в группе СД2. Итак, площадь под графиком у группы СД2 была значительно выше на 19 неделе и 21 неделе исследования по сравнению с контрольной группой, что может свидетельствовать о развитии инсулинорезистентности на 19 и 21 неделю применения ВЖД. Введение в течение 4 недель метформина, акарбозы и MgfII в дозах 0,005 мг/кг и 0,01 мг/кг привело к значительному снижению концентрации глюкозы в крови при моделировании экспериментального СД2 после введения инсулина в инсулинорезистентном тесте. Введение MgfII и препаратов сравнения в течение 2 недель не привело к снижению инсулинорезистентности, однако площадь под графиком концентрации глюкозы была значительно ниже у групп с введением метформина, акарбозы и MgfII в дозе 0,01 мг/кг. Таким образом, MgfII снижает инсулинорезистентность при его длительном пероральном введении на фоне ВЖД у мышей с экспериментальным СД2.

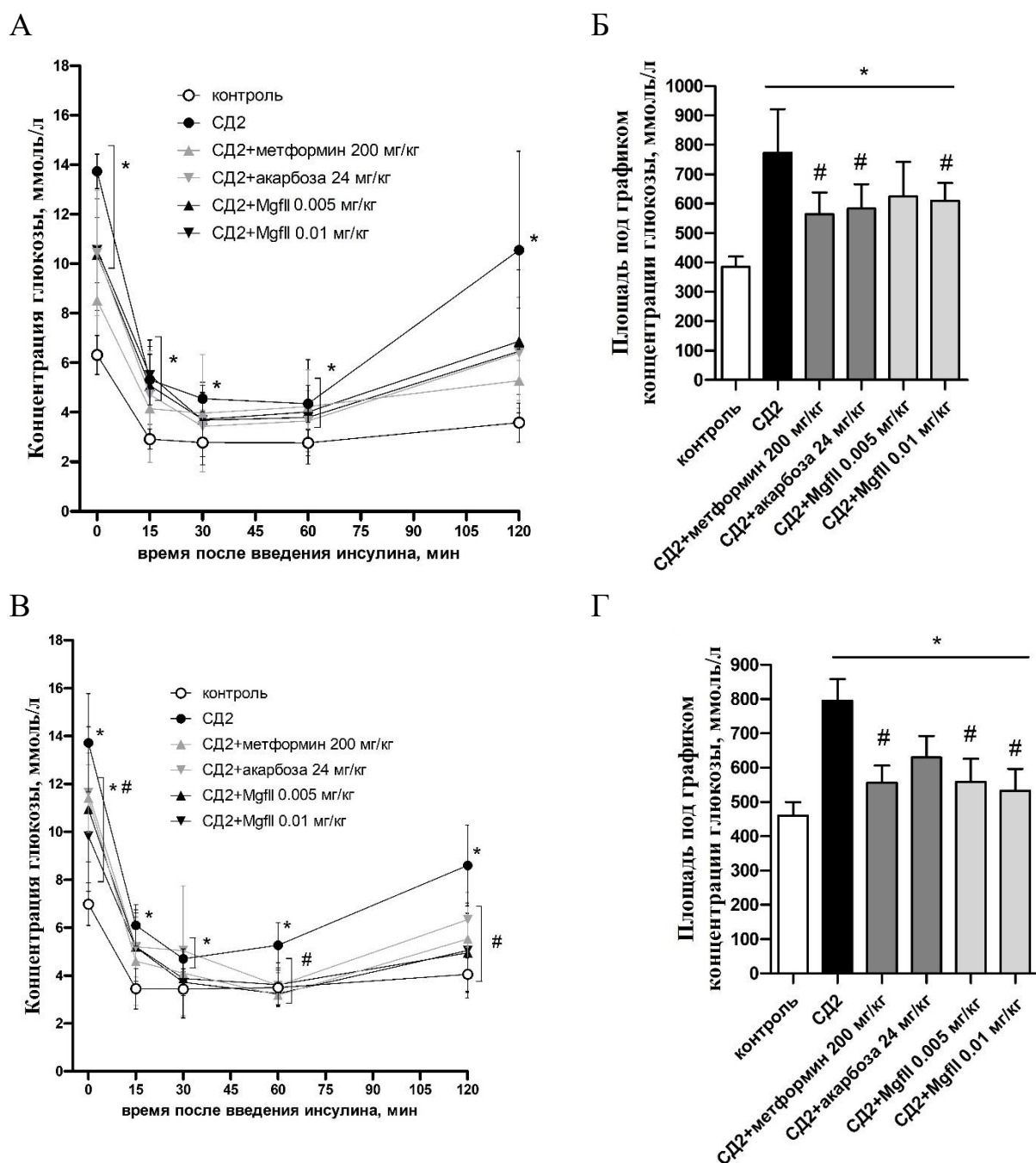


Рисунок 17 – Инсулинорезистентный тест. Абсолютные значения концентрации глюкозы в крови после введения инсулина на 19 неделю (А) и 21 неделю (В) исследования. Площадь под графиком концентрации глюкозы при проведении инсулинорезистентного теста на 19 (Б) и 21 (Г) неделю исследования.

Примечание – данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ относительно контрольной группы (тест Mann-Whitney); # $p < 0,05$ относительно группы СД2 (тест Mann-Whitney).

3.3.5 Эффективность MgflI на чувствительность к холоду, механическому стимулу и нагреванию

Применение ВЖД в течение 17, 19 и 21 недели привело к повышению чувствительности к холоду у животных. При нанесении ацетона на заднюю конечность, у животных группы СД2 отмечалось значительное увеличение продолжительности реакций относительно контрольной группы. Пероральное введение MgflI в дозе 0,01 мг/кг в течение 4 недель привело к значительному снижению продолжительности реакций на охлаждение на фоне экспериментального СД2 (Рисунок 18).

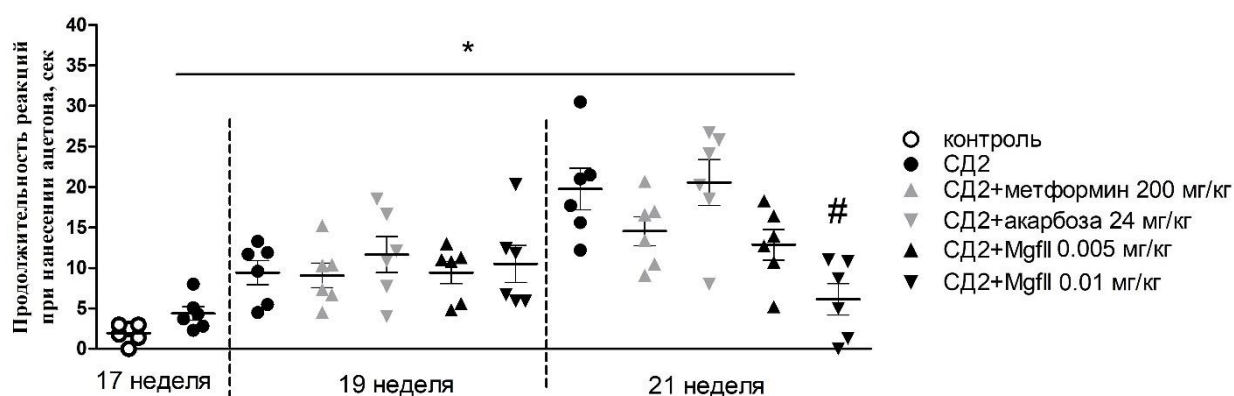


Рисунок 18 – Чувствительность животных к охлаждению при нанесении ацетона на заднюю конечность до введения и в период введения тестируемых веществ в течение 2 и 4 недель на фоне экспериментального СД2.

Примечание – данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ относительно контрольной группы (тест Mann-Whitney); # $p < 0,05$ относительно группы СД2 (тест Mann-Whitney).

Применение ВЖД в течение 19 и 21 недели привело к значительному повышению чувствительности задних конечностей животных к механической стимуляции филаментами фон Фрея. Введение тестируемых веществ не оказало значимого влияния на предотвращение развития чувствительности к механическим стимулам, однако при пероральном введении MgflI в дозе 0,01

мг/кг в течение 4 недель не наблюдалось значительных отличий от контрольной группы в силе давления филаментов (Рисунок 19).

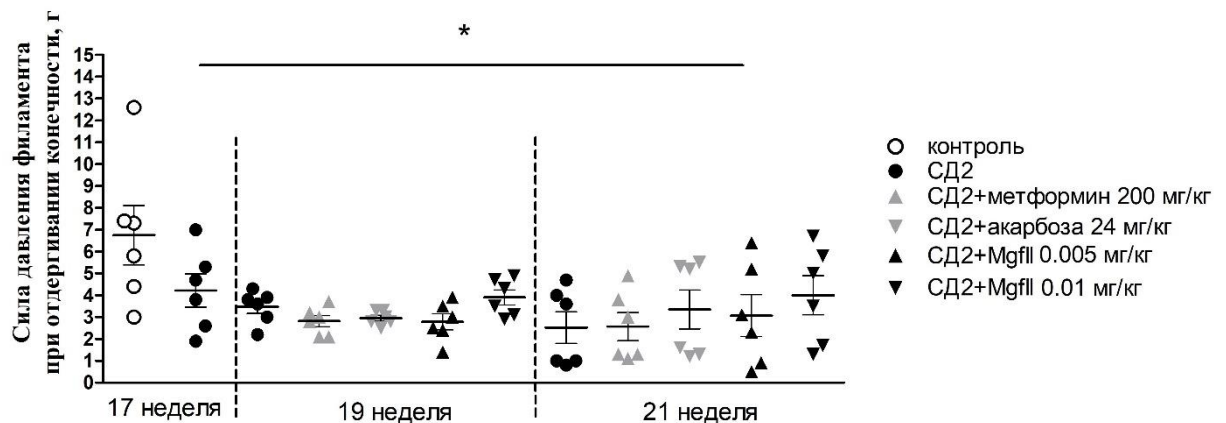


Рисунок 19 – Чувствительность к механическому стимулу до введения и в период введения тестируемых веществ в течение 2 и 4 недель на фоне экспериментального СД2.

Примечание – данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ относительно контрольной группы (тест Mann-Whitney).

Чувствительность к нагреванию была повышена у животных с экспериментальным СД2: латентное время подпрыгивания на горячей пластине было значительно снижено при моделировании экспериментального СД2 по сравнению с контролем. Введение метформина в течение 4 недель привело к повышению времени нахождения животных на горячей пластине до уровня контрольных животных. Введение Mgfl в дозе 0,005 мг/кг в течение 2 и 4 недель и в дозе 0,01 мг/кг – в течение 2 недель, привело к повышению времени нахождения животных на горячей пластине при моделировании экспериментального СД2 (Рисунок 20).

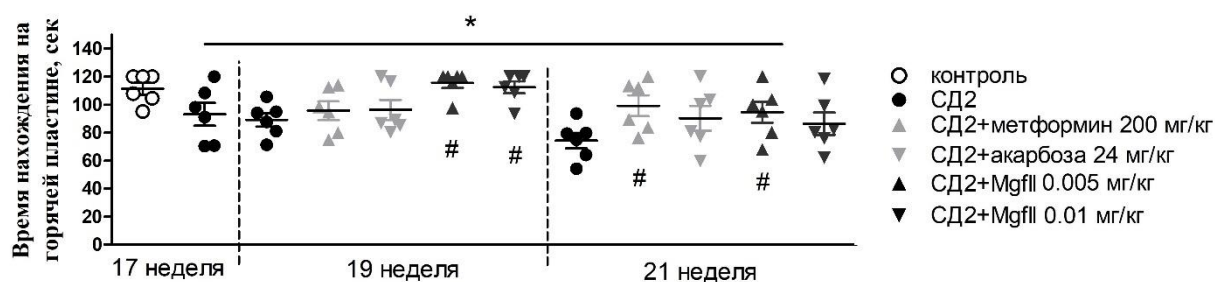


Рисунок 20 – Чувствительность к нагреванию у животных в тесте Hot Plate (температура нагревания 50°C) до введения и в период введения тестируемых веществ в течение 2 и 4 недель на фоне экспериментального СД2.

Примечание – данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ относительно контрольной группы (тест Mann-Whitney); # $p < 0,05$ относительно группы СД2 (тест Mann-Whitney).

Таким образом, у животных на ВЖД наблюдается характерная картина развития диабетической полинейропатии: повышение чувствительности к охлаждению и нагреванию конечностей, механическим стимулам, что может быть связано с микрососудистыми осложнениями на фоне гипергликемии. Введение Mgfl на фоне развития экспериментального СД2 наметило тенденции к восстановлению нормальной реакции животных к нагреванию и охлаждению конечностей, в то время как метформин проявил более слабый эффект только в тесте на горячей пластине.

3.3.6 Влияние Mgfl на биохимические показатели липидного обмена в сыворотке крови

Применение ВЖД в течение 17, 19 и 21 недели у животных группы СД2 привело к значительному повышению уровня холестерина, триглицеридов и ЛПНП (Рисунок 21). Введение тестируемых веществ не оказало влияния на

концентрацию холестерина и ЛПНП. Пероральное введение MgfII в дозе 0,01 мг/кг в течение 4 недель привело к снижению триглицеридов на фоне ВЖД.

Таким образом, как предполагалось, длительное применение ВЖД нарушает липидный профиль сыворотки крови у животных. Однако гипогликемические пероральные препараты не позволили восстановить нормальный уровень холестерина и ЛПНП, за исключением MgfII, который снизил концентрацию триглицеридов.

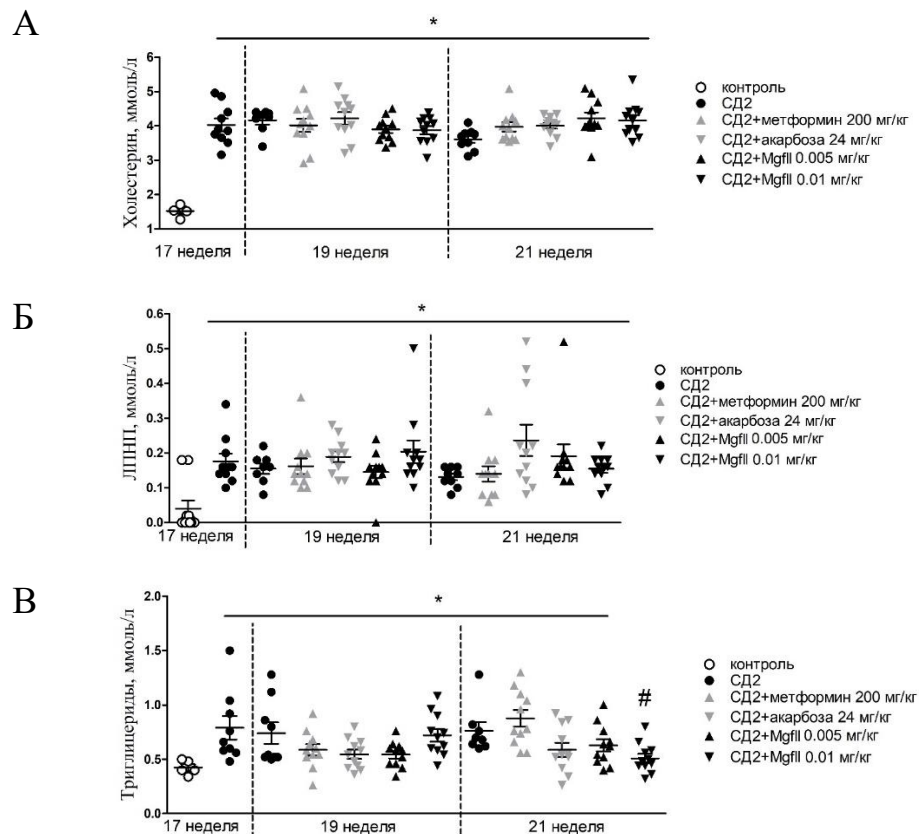


Рисунок 21 – Параметры биохимии сыворотки крови до введения и при введении тестируемых веществ в течение 2 и 4 недель на фоне экспериментального СД2. Концентрация холестерина (А); концентрация ЛПНП (Б); концентрация триглицеридов (В) в сыворотке крови.

Примечание – данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ относительно контрольной группы (тест Mann-Whitney); # $p < 0,05$ относительно группы СД2 (тест Mann-Whitney).

3.3.7 Влияние MgflI на патофизиологические показатели ожирения

У животных группы СД2, начиная с 17 недели ВЖД, наблюдалось значительное повышение коэффициента массы висцеральной жировой ткани относительно контрольной группы (Рисунок 22). Введение метформина, начиная со 2 недели снизило коэффициент массы жировой ткани по сравнению с группой СД2. Пероральное введение MgflI в дозах 0,005 мг/кг и 0,01 мг/кг привело к значительному снижению коэффициента массы жировой ткани с 4 недели его применения на фоне ВЖД.

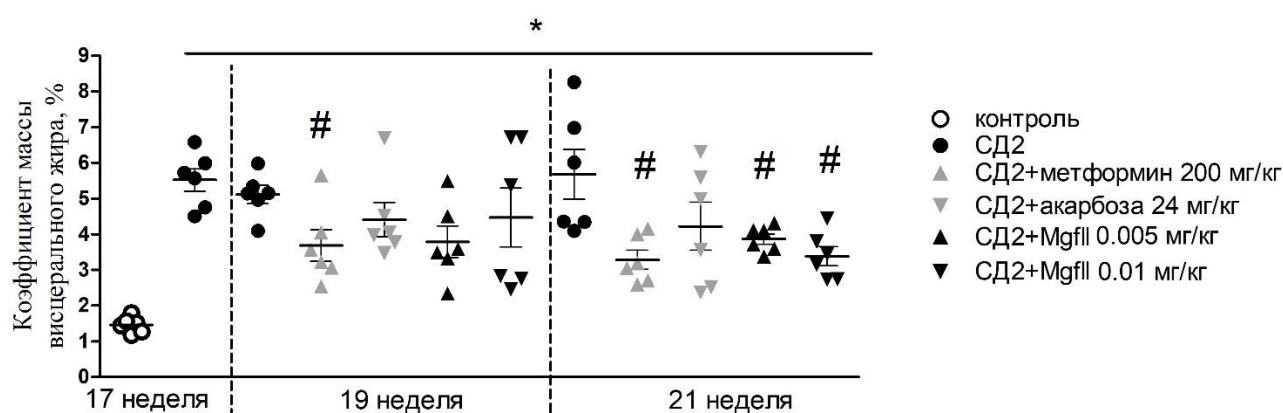


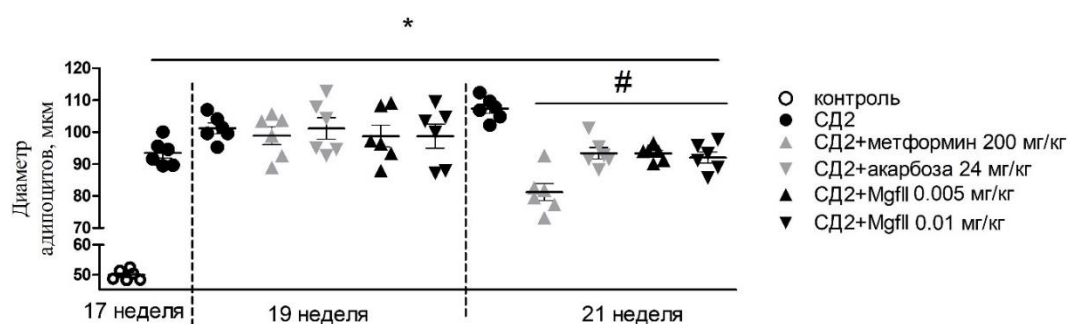
Рисунок 22 – Коэффициент массы жировой ткани, окружающей придатки семенников до введения и при введении тестируемых веществ в течение 2 и 4 недель.

Примечание – данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ относительно контрольной группы (тест Mann-Whitney);
 $^{\#}p < 0,05$ относительно группы СД2 (тест Mann-Whitney).

У животных, находящихся на ВЖД в течение 17-21 недели, значительно увеличился средний диаметр адипоцитов висцерального жира (Рисунок 23). Пероральное введение метформина, акарбозы и MgflI в дозах 0,005 мг/кг и 0,01 мг/кг через 4 недели снизило диаметр адипоцитов висцерального жира на фоне ВЖД.

Таким образом, исследуемые гипогликемические пероральные препараты позволили снизить массу висцеральной жировой ткани на фоне ВЖД, несмотря на отсутствие эффективности в отношении липидных показателей сыворотки.

А



Б

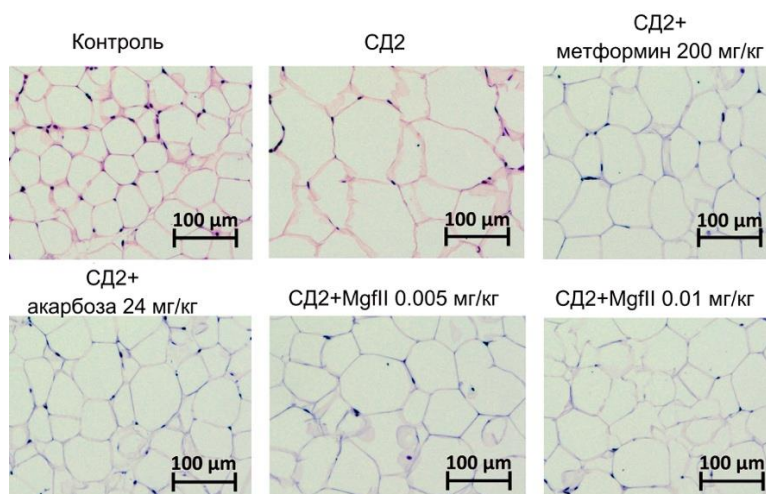


Рисунок 23 – Показатели ожирения до введения и при введении тестируемых веществ в течение 2 и 4 недель. А – диаметр адипоцитов висцерального жира.

Примечание – данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ относительно контрольной группы (тест Mann-Whitney); # $p < 0,05$ относительно группы СД2 (тест Mann-Whitney). Б – микрофотографии висцеральной жировой ткани, окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100х.

Глава 4. Обсуждение результатов

Отличительной характеристикой сахарного диабета является повышенный уровень глюкозы в крови из-за дефицита концентрации и/или чувствительности к инсулину [163]. Значительное повышение глюкозы в крови после приема пищи у людей с сахарным диабетом является причиной нарушения антиоксидантной защиты и следующего развития множества патологических процессов [50, 76, 77, 101, 131, 142, 156]. Эти патологические процессы связаны с микро- и макрососудистыми нарушениями, вследствие чего снижаются функции многих жизненно важных органов: почек, сердечно-сосудистой системы, сетчатки и нервной системы, кожи. Фиброз печени и фиброз легких, когнитивная дисфункция появляются как новые патологии, развивающиеся при гипергликемии вторично [85, 110, 123, 142]. Поэтому в терапии сахарного диабета важно контролировать постпрандиальный уровень глюкозы с целью снижения образования конечных продуктов гликирования, которые идентифицированы как основной фактор риска сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с диабетом. Потребность в разработке гипогликемических препаратов с меньшим количеством побочных эффектов до сих пор не удовлетворена из-за ограниченной эффективности или недостатков в имеющихся терапевтических препаратах [165]. Прослеживается тенденция поиска природных гипогликемических препаратов из природного сырья для терапии сахарного диабета, и некоторые из них уже показали свою эффективность *in vitro* и *in vivo* [115, 134, 139, 140, 163].

В рамках проведенного исследования на экспериментальной модели гипергликемии и экспериментального СД2 была изучена эффективность пептидов Mgf и MgfII, которые известны своей высокой ингибирующей активностью в отношении слюнных и панкреатических α -амилаз *in vitro* [14, 66]. Mgf и MgfII, пептидные ингибиторы α -амилаз, обнаруженные в яде морской анемоны *Heteractis magnifica* отличаются более выраженной ингибиторной активностью относительно слюнной и панкреатической α -амилаз

млекопитающих *in vitro*, чем акарбоза [114]. Основным препятствием для работы пептидных ингибиторов α -амилаз является pH желудка и протеолитические ферменты. Ферменты желудочно-кишечного тракта являются основными источниками деградации пероральных пептидов, но для проявления их эффекта им необходим оптимальный pH [174]. Mgf и MgfII, аналогично недавно открытому пептидному ингибитору α -амилаз хелиантамиду, имеют превосходную устойчивость к нагреванию и низкому pH. Вероятно, эта устойчивость связана с наличием гидрофобных аминокислот, которые стабилизируют контакт активного центра с α -амилазой, а наличие дисульфидных мостиков делает хелиантамид, Mgf и MgfII устойчивыми к гидролазам [108]. В связи с высокой эффективностью ингибирования α -амилаз и высокой вероятностью устойчивости в желудке млекопитающих, Mgf и MgfII имеют потенциал перорального применения в клинике. Открывающиеся возможности позволили изучить эффективность Mgf и MgfII на экспериментальных моделях СД2 при их пероральном способе введения.

Способность Mgf и MgfII снижать постпрандиальный уровень глюкозы *in vivo* была изучена в крахмальном пероральном тесте у гипергликемических животных. Стандартная методика исследования веществ, влияющих на всасывание глюкозы в желудочно-кишечном тракте, в том числе ингибиторов α -гликозидаз, предполагает использование мальтозы в дозе 3 г/кг при пероральном введении у животных [17]. Однако в настоящем исследовании для Mgf и MgfII была исследована ингибиторная активность в отношении α -амилаз. Субстратом для α -амилаз являются полисахариды, также имеющие α -1,4 гликозидные связи, поэтому в качестве имитации потребления пищи животными использовался крахмал, а не мальтоза.

В качестве препарата сравнения в проведенном исследовании использовалась акарбоза в дозе 24 мг/кг, как наиболее широко используемый ингибитор α -гликозидаз, имеющий также ингибиторную активность в отношении α -амилаз [118]. Среди существующих ингибиторов α -амилаз, еще ни один препарат не зарегистрирован для клинического применения, поэтому в

качестве препарата сравнения применялся ингибитор α -гликозидаз акарбоза, которая также ингибирует α -1,4 гликозидные связи, как Mgf и MgfII. С целью определения эффективной дозы пептидов для *in vivo* исследований использовались дозы рекомбинантного Mgf, составляющие 0,1 мг/кг, 0,01 мг/кг, 0,005 мг/кг, 0,0025 мг/кг, 0,001 мг/кг и дозы рекомбинантного MgfII, составляющие 0,01 мг/кг, 0,005 мг/кг, 0,001 мг/кг, 0,0005 мг/кг и 0,0001 мг/кг при пероральном способе введения. Дозы вводились животным за 45 минут перед проведением крахмального теста.

Было предположено, что Mgf и MgfII значительно замедляют расщепление крахмала, и, следовательно, снижают постпрандиальную концентрацию глюкозы в крови после поступления пищи. В пероральном крахмальном тесте определена эффективная доза Mgf – 0,005 мг/кг. При введении Mgf в дозе 0,005 мг/кг 45 минут перед крахмальным тестом изменения в концентрации глюкозы были равны изменениям концентрации глюкозы у контрольных животных и у животных с введением акарбозы. Эффективные дозы MgfII – 0,01 мг/кг и 0,005 мг/кг, вводимые за 45 минут до крахмального теста, снижали постпрандиальный уровень глюкозы эффективнее, чем акарбоза в дозе 24 мг/кг. Таким образом, эффективные дозы, определенные для Mgf – 0,005 мг/кг и для MgfII – 0,01 мг/кг и 0,005 мг/кг. Стоит отметить, что для Mgf и MgfII проводилось исследование безопасности и острой токсичности, в результате которого не выявлено нежелательных явлений в диапазонах доз до 2 мг/кг при однократном пероральном и внутривенном введении у мышей ICR [66]. Таким образом, эффективные дозы для перорального однократного введения Mgf и MgfII в 400 и 200 раз меньше исследованных безопасных доз.

При уменьшении доз пептидов, эффективного снижения постпрандиального уровня глюкозы не наблюдается, что, вероятно, связано с недостаточной насыщенностью α -амилазы пептидами. Однако повышение дозы Mgf до 0,1 мг/кг и 0,01 мг/кг также не продемонстрировало значительного снижения постпрандиального уровня глюкозы, что может быть связано с характерным куполообразным эффектом. Куполообразный эффект является

характерным для пептидных молекул и, вероятно, связан с принципом обратной связи [166].

В настоящей диссертационной работе не ставилась задача по изучению фармакокинетики Mgf и MgfII, поэтому выдвигаются следующие предположения по влиянию исследованных пептидов на инсулинорезистентность и концентрацию глюкозы натощак. Задержка переваривания углеводов и расщепление олигосахаридов с помощью α -гликозидаз и α -амилаз приводит к тому, что непереваренные углеводы достигают нижних отделов тонкой кишки и стимулируют секрецию GLP-1. Этот кишечный гормон задерживает опорожнение желудка, снижает секрецию глюкагона и регулирует секрецию инсулина, которая фактически зависит от концентрации глюкозы в крови. Этот сигнальный путь может частично объяснить, почему длительное лечение акарбозой приводит к снижению не только постпрандиальной, но и тощаковой глюкозы [82]. Можно предположить, что введение адекватных доз высоковязкой растворимой клетчатки глюкоманнана или ингибирующих амилазу фитохимических веществ, будут имитировать эффект акарбозы или других фармацевтических ингибиторов α -гликозидазы. Однако глюкоманнан имеет потенциальный недостаток – он препятствует всасыванию некоторых совместно принимаемых лекарств или жирорастворимых витаминов. Пребиотики могут стимулировать выработку GLP-1 в толстой кишке, поскольку жирные кислоты с короткой цепью действуют на L-клетки, стимулируя высвобождение GLP-1. Пребиотики, такие как инулин или резистентный крахмал, могут имитировать опосредованные GLP-1 эффекты акарбозы, но они не будут снижать постпрандиальный уровень глюкозы. Таким образом, изучение пероральных ингибиторов α -амилаз остается перспективным направлением в изучении контроля постпрандиального уровня глюкозы с сопровождающим эффектом на секрецию GLP-1 [118]. Рецепторы свободных жирных кислот экспрессируются в L-клетках кишечника и имеют разную аффинность к свободным жирным кислотам. Вероятно, что MgfII воздействует на рецепторы свободных жирных кислот, которые способны

повышать экспрессию GLP-1 [24, 27, 93]. Есть предположение, что пептиды оказывают влияние на эти рецепторы, и таким образом повышают усваиваемость глюкозы инсулин-зависимыми тканями. Также имеются данные, что олигосахариды, не успевшие распасться до глюкозы в тонком кишечнике благодаря α -гликозидазам, попадают в толстый кишечник, где они уже будут превращаться в свободные жирные кислоты. И полученные из олигосахаридов свободные жирные кислоты будут взаимодействовать с соответствующими им рецепторами и усиливать экспрессию GLP-1 [104]. Таким образом, существует несколько гипотез того, как Mgf-II может влиять на инсулинорезистентность и концентрацию глюкозы в крови натощак. Длительное применение ингибиторов α -амилаз является перспективной стратегией в терапии СД2 [82].

Исходя из этих предположений, было продолжено изучение эффективности MgfII на экспериментальной модели СД2 при его курсовом введении в течение 4 недель. В качестве препарата сравнения использовались метформин и акарбоза. Метформин был выбран в качестве препарата сравнения как лекарственное средство первой линии при терапии СД2. Действительно, в результате была обнаружена эффективность длительного применения MgfII, перорального ингибитора α -амилаз, на модели экспериментального СД2. MgfII в дозах 0,005 мг/кг и 0,01 мг/кг эффективно снижал концентрацию глюкозы натощак после 2 и 4 недель его ежедневного введения наравне с метформином и акарбозой. MgfII в обеих дозах значительно снижал постпрандиальный уровень глюкозы в крахмальном тесте на фоне моделирования экспериментального СД2. Таким образом, MgfII на фоне экспериментального СД2 способен контролировать как тощаковый, так и постпрандиальный уровень глюкозы при приеме сложных углеводов. Эпизодическое значительное повышение уровня глюкозы при приеме пищи у людей с СД2 оказывает более заметное влияние на развитие окислительного стресса, чем устойчивое повышение уровня глюкозы. Кроме того, эпизодическая гипергликемия в сочетании с повышенным содержанием свободных жирных кислот также оказывает оксидантное действие на β -клетки поджелудочной железы. У преддиабетиков эта

«глюколипотоксичность» может привести к нарушению стимулированной глюкозой секреции инсулина и апоптозу β -клеток, что без контроля диеты разовьется в СД2 [118]. Следовательно, снижение постпрандиального уровня глюкозы с помощью MgfII может быть особенно полезным в качестве стратегии профилактики СД2 при преддиабете.

Изменение липидного профиля является ранним маркером нарушения углеводного обмена [40]. Традиционным нарушением при сахарном диабете считается повышение концентрации триглицеридов, секреции ЛПОНП и нарушение клиренса ЛПОНП и хиломикронов, повышение уровня ТГ. Все эти изменения относятся к атерогенным факторам риска, и неслучайно распространенность сердечно-сосудистых осложнений остается важной проблемой при сахарном диабете [86, 87]. В проведенном исследовании, у животных с экспериментальным СД2 прослеживалось значительное увеличение в сыворотке крови концентрации холестерина, триглицеридов и ЛПНП. Увеличение уровня триглицеридов, холестерина, ЛПНП аналогично наблюдается при развитии метаболического синдрома в клинической практике [41]. В качестве монотерапии при СД2 метформин действует непосредственно на глюконеогенез, а также на инсулиновые рецепторы, и таким образом регулирует уровень глюкозы в крови и чувствительность тканей к инсулину. Поэтому метформин применяется в клинической практике в сочетании с другими противодиабетическими препаратами для контроля липидного обмена и снижения риска сердечно-сосудистых осложнений [164].

MgfII в дозе 0,01 мг/кг при пероральном введении в течение 4 недель снижал концентрацию триглицеридов в крови на фоне экспериментального СД2, в отличие от метформина и акарбозы. Таким образом, остается актуальной применение сочетанной терапии в лечении СД2 –гипогликемических препаратов в комбинации со статинами [109, 164].

При нарушении липидного обмена происходит избыточное накопление триглицеридов в адипоцитах и отложение липидных включений в гепатоцитах. Увеличение размера адипоцитов приводит к нарушению метаболизма, так как

жировая ткань является эндокринным органом, выделяющим гормоны и адипокины, в том числе адипонектин, лептин и резистин. При ожирении гиперлептинемия и лептинорезистентность обуславливают возникновение относительного дефицита лептина и, следовательно, снижение его физиологических эффектов [40]. Количество высвобождаемых IL-6, лептина и НЭЖК может изменяться при ожирении, что связано с увеличением размера адипоцитов. Размер адипоцитов влияет на передачу гормональных сигналов внутри самой жировой ткани и к другим органам, например мышцы и печень и, таким образом, также могут влиять на чувствительность к инсулину. Кроме того, локальные уровни IL-6 и TNF- α могут быть повышены за счет воспалительной реакции, опосредованной инвазией макрофагов, вызванной увеличенными жировыми клетками, которые демонстрируют ускоренную гибель клеток. В проведенном исследовании нахождение мышей C57BL/6J на ВЖД увеличило коэффициент массы жировой ткани по сравнению с животными на стандартной диете, а также диаметр адипоцитов висцеральной жировой ткани. MgfII, вводимый в течение 4 недель в дозах 0,005 мг/кг и 0,01 мг/кг привел к снижению коэффициента массы висцерального жира и диаметра адипоцитов висцерального жира, аналогично метформину и акарбозе. В других исследованиях у акарбозы обнаружена способность к снижению веса, что также характерно для долгоживущих миметиков GLP-1, используемых в настоящее время в терапии СД2 [118].

Сочетание экологических факторов, таких как переедание, повышенная липолитическая активность и гипертрофия адипоцитов вместе с генетической предрасположенностью играют важную роль в развитии резистентности к инсулину, что играет центральную роль в установлении СД2. Инсулинорезистентность описывает ряд молекулярных фенотипов, при которых физиологические регуляторные функции инсулина подавлены или изменены. В периферических тканях, таких как скелетные мышцы и жировая ткань, инсулин регулирует поглощение глюкозы, тогда как в печени он подавляет глюконеогенез. Кроме того, инсулин стимулирует постпрандиальный липогенез

и синтез гликогена и белка, но ингибирует липолиз, гликогенолиз и катаболизм белков [98, 30]. Для моделирования экспериментального СД2 в качестве тест-систем мышцы линии C57BL/6J были выбраны в связи с их генетическими особенностями. Обнаружено, что у мышей линии C57BL/6J есть склонность к развитию лептинорезистентности. Более того, у мышей C57BL/6J имеется нарушение глюкозного транспорта [46, 72] что делает эту тест-систему подходящей именно для изучения инсулинорезистентности на фоне СД2. Поэтому кормление предрасположенных к метаболическим нарушениям мышей линии C57BL/6J высокожировым кормом в течение 19 недель позволило добиться развития инсулинорезистентности, и на 21 неделю кормления ВЖД отмечалась аналогичная тенденция. Таким же образом инсулинорезистентность на мышцах C57BL/6J была получена у Elabi и др., где для формирования инсулинорезистентности применялось сочетание экологических и генетических факторов [99]. Многие исследования на животных и людях показали, что нарушение усвоения глюкозы, опосредованное GLUT4, является основным механизмом, лежащим в основе инсулинорезистентности. Это подтверждается экспериментом, где у гипертензивных крыс с метаболическим синдромом было обнаружено снижение экспрессии GLUT4 и инсулинорезистентность. Так же снижение GLUT4 наблюдалось у крыс Wistar с инсулинорезистентностью и значительно повышенным уровнем триглицеридов [120]. Многие исследования отмечают, что метформин влияет на экспрессию, транслокацию и функцию GLUT4, но не объясняют основные молекулярные механизмы. У крыс с экспериментальным СД2 лечение метформином в течение 4 недель приводило к значительному снижению инсулинорезистентности и значительному увеличению экспрессии GLUT4 в сердце, печени и висцеральном жире. В исследовании на мышях с диабетом лечение метформином улучшало экспрессию GLUT4 в скелетных мышцах [86]. При исследовании уровня инсулина в сыворотке крови, нами были получены неадекватные для статистической обработки данные, поэтому инсулинорезистентность регистрировалась по стандартной методике в инсулинорезистентном тесте [17].

В настоящем исследовании инсулинорезистентность у мышей с экспериментальным СД2 также была снижена путем применения метформина в дозе 200 мг/кг и акарбозы в дозе 24 мг/кг в течение 4 недель, что подтверждает релевантность экспериментального СД2. В то же время, применение MgfII в дозах 0,005 мг/кг и 0,01 мг/кг в течение 4 недель на экспериментальной модели СД2 привело к значительному снижению инсулинорезистентности, аналогично метформину в дозе 200 мг/кг. Можно сделать вывод, что MgfII, несмотря на отличающийся от метформина механизм действия, влияет на чувствительность тканей к инсулину при длительном применении.

Неконтролируемая гипергликемия, возникающая при развитии инсулинорезистентности, ведет к формированию множества микрососудистых и макрососудистых осложнений. Растущий объем литературы связывает преддиабет, ожирение и метаболический синдром с риском диабетической периферической нейропатии, а также криптогенной сенсорной периферической нейропатии, что относится к микрососудистым осложнениям, возникающим при продолжительной гипергликемии [34]. В проведенном исследовании у животных с моделированием экспериментального СД2 наблюдалась повышенная чувствительность к механическому воздействию филаментами, охлаждению и нагреванию конечностей, что может свидетельствовать о развитии диабетической полинейропатии. Пероральное введение MgfII в дозе 0,01 мг/кг в течение 4 недель демонстрирует тенденцию к восстановлению нормальной чувствительности к холоду и механическому стимулу у конечностей, в то время как пероральное введение MgfII в дозе 0,005 мг/кг активнее восстанавливало чувствительность к нагреванию. Введение метформина проявило более слабую протективную активность в отношении развития нейропатии по сравнению с MgfII. Известно, что продолжительная гипергликемия влияет не только на периферические нервы, но и на трофику сетчатки [112]. Существует много сведений о развитии ретинопатии у людей с сахарным диабетом [94]. В настоящем исследовании в связи с этими соображениями у мышей с экспериментальным СД2 проводилась офтальмоскопия. Однако патологий

сетчатки и изменения сосудистой сетки обнаружено не было. Вероятно, для развития ретинопатий необходимо более длительное применение ВЖД и гипергликемическое состояние животных.

Одним из очевидных признаков развития гипергликемии является повышение диуреза, повышение уровня глюкозы в моче, и, в связи с этим, полидипсия [92]. Однако в настоящем исследовании у мышей C57BL/6J, находящихся на ВЖД в течение 17, 19 и 21 недели, не было обнаружено изменений в общем анализе мочи и в диурезе, и не было отмечено повышения потребления воды. Введение MgfII, акарбозы и метформина так же не повлияло на изменение биохимических показателей мочи.

В инкреторном отделе поджелудочной железы у отдельных животных отмечали вакуолизацию единичных клеток островков Лангерганса. При гистологическом анализе наблюдалось снижение площади островков Лангерганса на срезах поджелудочной железы у животных с моделированием экспериментального СД2 в отличие от контроля, однако судить эффективности метформина, акарбозы и MgfII не было выявлено. Также был проведен гистологический анализ аорты и сердца, почек и печени. У двух животных, находящихся на ВЖД, в миокарде обнаруживали немногочисленные кардиомиоциты с признаками мелкокапельной жировой дистрофии. В аорте каких-либо отклонений от нормы не наблюдалось. В печени мышей, содержащихся в условиях высокожировой диеты, отмечали очаговую крупнокапельную жировую дистрофию гепатоцитов, наиболее выраженную в хвостатой доле органа. На фоне терапевтической коррекции данного состояния метформин продемонстрировал положительную динамику, как при 2-х, так и при 4-х недельном курсе введения. В печени мышей на фоне введения акарбозы и MgfII в обеих дозах эффективности не наблюдали. В почках на фоне 17-недельного применения ВЖД наблюдалась унилатеральная пиелэктазия с субтотальной атрофией паренхимы органа и поликистоз у 4 из 6 мышей, при этом повсеместно в эпителиоцитах проксимальных почечных канальцев обнаруживали явления жировой дистрофии разной степени выраженности.

Небольшая положительная динамика в оценке жировой дистрофии эпителиоцитов проксимальных почечных канальцев наблюдалась в группе с применением MgfII в дозе 0,01 мг/кг.

Таким образом, результаты, представленные в настоящей работе, свидетельствуют о наличии эффективности перорального введения пептидных ингибиторов α -амилаз Mgf и MgfII *in vivo* в коррекции метаболических нарушений, возникающих при экспериментальном СД2. Полученные результаты позволяют продолжать исследования эффективности MgfII в качестве перорального антигипергликемического средства для контроля постпрандиального уровня глюкозы, инсулинорезистентности, ожирения и развития полинейропатий при СД2. MgfII может стать высокоэффективной и безопасной альтернативой для пероральных ингибиторов α -амилаз в лечении СД2.

ВЫВОДЫ

1. Пептидные ингибиторы α -амилаз Mgf и MgfII проявляют антигипергликемические свойства при их однократном пероральном введении мышам ICR. Пероральное введение Mgf в дозе 0,005 мг/кг за 45 минут до приема крахмала приводит к снижению площади под графиком постпрандиальной концентрации глюкозы у гипергликемических мышей ICR на 8,5 %. Пероральное введение MgfII в дозах 0,01 мг/кг и 0,005 мг/кг за 45 минут до приема крахмала приводит к снижению площади под графиком постпрандиальной концентрации глюкозы у гипергликемических мышей ICR на 13,9 % и 12,1 % соответственно.

2. Пероральное введение MgfII в дозе 0,005 мг/кг в течение 2 и 4 недель снижает концентрацию глюкозы в крови натощак на 3,3 ммоль/л и 2,8 ммоль/л соответственно. Пероральное введение MgfII в дозе 0,01 мг/кг в течение 2 и 4 недель снижает концентрацию глюкозы в крови натощак на 3,1 ммоль/л и 3,9 ммоль/л соответственно. Пероральное введение MgfII в дозе 0,01 мг/кг в течение 2 и 4 недель снижает постпрандиальный уровень глюкозы в крахмальном тесте на 27,2 % и 32 % соответственно, а также снижает инсулинорезистентность на 2 неделю и 4 неделю введения на 21,7 % и 29,7 % соответственно при подсчете площади под графиком концентрации глюкозы у мышей с экспериментальным СД2.

3. Пероральное введение MgfII в течение 4 недель у животных с экспериментальным СД2 снижает развитие ожирения. Пероральное ведение в течение 4 недель MgfII в дозах 0,005 мг/кг и 0,01 мг/кг привело к значительному снижению прироста массы тела на 2,8 % и 2,4 % соответственно, к снижению коэффициента массы жировой ткани на 31,9 % и 32,4 % соответственно, а также к снижению диаметра адипоцитов на 13 % и 14,2 % соответственно у мышей C57BL/6J на фоне моделирования экспериментального СД2.

4. Пероральное введение MgfII в дозе 0,01 мг/кг и 0,01 мг/кг в течение 4 недель предотвращает повышение чувствительности к охлаждению на 67 %.

Пероральное введение MgflI в дозе 0,005 мг/кг в течение 2 и 4 недель предотвращает повышение чувствительности к нагреванию на 22,9 % и 21,4 % соответственно, а MgflI в дозе 0,01 мг/кг – при его пероральном введении в течение 2 недель на 20,7 % у мышей C57BL/6J на фоне моделирования экспериментального СД2 в течение 21 недели.

Список сокращений и условных обозначений

АДФ – аденозиндифосфат

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ВЖД – высокожировая диета

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

НЭЖК – неэтерифицированные жирные кислоты

ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

СД – сахарный диабет

СД1 – сахарный диабет 1 типа

СД2 – сахарный диабет 2 типа

СТД – стандартная диета

СТЗ – стрептозоцин

ЩФ – щелочная фосфатаза

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

3D-QSAR – 3D-quantitative structure-activity relationships (количественная взаимосвязь между пространственной структурой и активностью)

AAI – Alpha-Amylase Inhibitor

AUC – Площадь под графиком

FFA – free fatty acids (свободные жирные кислоты)

HPA – human pancreatic α -amylase (человеческая панкреатическая α -амилаза)

HSA – human salivary α -amylase (человеческая слюнная α -амилаза)

GIP - glucose-dependent insulintropic polypeptide (глюкозозависимый инсулинотропный пептид)

GLP – good laboratory practice (надлежащая лабораторная практика)

GLP-1 – glucagon-like peptide-1 (глюкагоноподобный пептид-1)

IL-21 – interleukin 21 (интерлейкин-21)

IL-6 – interleukin 6 (интерлейкин-6)

Ki – константа ингибирования

Mgf – magnificamide (магнификамид)

MgfII – magnificamide-II (магнификамид)

PBS – phosphate-buffered saline (натрий-фосфатный буфер)

PPA – porcine pancreatic α -amylase (свиная панкреатическая α -амилаза)

PPARs – peroxisome Proliferator-Activated Receptors (Гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом)

HbA1c – hemoglobin A1C (гликированный гемоглобин)

HLA – human leukocyte antigens (человеческие лейкоцитарные антигены)

SGLT – sodium-dependent glucose cotransporters (натрийзависимые котранспортеры глюкозы)

TNF- α – tumor necrosis factor alpha (фактор некроза опухоли α)

SMILES – simplified molecular-input line-entry system (система упрощённого представления молекул в строке ввода)

Список литературы

1. Алешин, Д. А. Мишень-ориентированный поиск антидиабетических средств [Текст]: монография / Алешин Д. А. [и др.]; под редакцией Спасова А. А., Петрова В. И. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ. – 2016. – 232 с.
2. Аметов А. С. Инсулинорезистентность и липотоксичность - две грани одной проблемы при сахарном диабете типа 2 и ожирении / А. С. Аметов, Е. А. Тертычная // Эндокринология: новости, мнения, обучение. 2019. Т. 8, № 2. С. 25-33.
3. Антидиабетогенный потенциал бензимидазолов: химия, фармакология, клиника: монография / Под ред. акад. РАН А. А. Спасова; акад. РАН В. И. Петрова, акад. РАН В. И. Минкина. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ. – 2016. – 548 с.
4. Астахова Л. В. Роль внутриклеточных жировых включений в возникновении сахарного диабета 2 типа / Л. В. Астахова, Д. С. Кацеров, Л. В. Мацкова // Сахарный диабет. – 2020. – Т. 23. – №3. – С. 267-274.
5. Взаимодействие воспаления и инсулиновой резистентности: молекулярные механизмы в инсулинопродуцирующих и инсулинозависимых тканях / А. Д. Юдаева, Ю. С. Стафеев, С. С. Мичурина [и др.] // Сахарный диабет. – 2023. – Т. 26. – №1. – С. 75-81.
6. Гетерогенность болевой диабетической полинейропатии и дифференцированный подход к ее лечению / О. Е. Хуторная, В. Б. Бреговский, А. Г. Демина [и др.] // Сахарный диабет. – 2013. – Т. 16. – №2. – С. 62-66.
7. Джеллингер П. С. Постпрандиальная гипергликемия и сердечно-сосудистый риск / П. С. Джеллингер // Сахарный диабет. – 2004. – Т. 7. – №2. – С.4-8.
8. Дзгоева Ф. Х. Кишечная микробиота и сахарный диабет типа 2 / Ф. Х. Дзгоева, Л. В. Егшатын // Эндокринология: новости, мнения, обучение. – 2018. – Т. 7. – № 3. – С. 55-63.

9. Изучение гипогликемической активности субетты и росиглитазона на модели стрептозотоцинового диабета у крыс / И. А. Хейфец, А. А. Спасов, М. П. Воронкова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2012. – Т. 153. – №1. – С. 62-64.
10. Криспамид – ингибитор α -амилазы из актинии *Heteractis crispa* / Р. С. Калина, И. Н. Гладких, М. М. Монастырская [и др.] // Научные труды. Объединенный научный форум. Международная научная конференция по биоорганической химии «XII Чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова». VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды», Москва, Россия, 18–22 сент. 2017 // ActaNaturae. – 2017. – Спецвып. – С. 32-33.
11. Лекарственный патоморфоз экспериментального сахарного Диабета / Г. Л. Снигур, А. В. Смирнов, А. А.Спасов [и др.] // ВНМТ. – 2011. – №2. – С. 169-173.
12. Ленская К. В. Инновационные направления поиска лекарственных препаратов для лечения сахарного диабета типа 2 / К. В. Ленская, А. А. Спасов, Н. И. Чепляева // Вестник ВолГМУ. – 2011. – №4 (40). – С.10-18.
13. Лискер А. В. Глюкагоноподобный пептид-1 у пациентов с сахарным диабетом 2 типа на инсулинотерапии / А. В. Лискер, Г. В. Семикова, А. Р. Волкова // Эндокринология: новости, мнения, обучение. – 2022. – Т. 11. – № 2. – С. 9-13.
14. Магнификамид - новый эффективный ингибитор α -амилаз млекопитающих / О.В. Синцова, Е.В. Лейченко, И.Н. Гладких [и др.] // Доклады академии наук. Биохимия, Биофизика, Молекулярная биология. – 2019. – Т. 489. – № 4. – С. 429–443.
15. Майоров А. Ю. Комментарии к Руководству Международной Диабетической Федерации по контролю постпрандиальной гликемии / А. Ю. Майоров // Сахарный диабет. – 2008. – Т.11. – №2. – С. 84-85.
16. Маслова О. В. Эпидемиология сахарного диабета и микрососудистых осложнений / О. В. Маслова, Ю. И Сунцов // Сахарный диабет. – 2011. – Т. 14. – №3. – С. 6-11.

17. Методические рекомендации по доклиническому изучению пероральных лекарственных средств для лечения сахарного диабета / А. А. Спасов [и др.] // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Том 1. Тула: Гриф и К, 2012. С. 672-686.
18. Мисникова И. В. Влияние времени приема пищи на постпрандиальную гликемию у пациентов с сахарным диабетом 2 типа и ожирением, не получающих инсулин / И. В. Мисникова, Д. Э. Золоева, А. А. Глазков // Сахарный диабет. – 2023. – Т. 26. – №5. – С. 455-463.
19. Мишарова А. П. Роль пластичности жировой ткани в управлении ожирением и сахарным диабетом / А. П. Мишарова, А. С. Аметов // Эндокринология: новости, мнения, обучение. – 2022. – Т. 11. – № 2. – С. 64-70.
20. Нобелевские открытия в истории обмена веществ и диабетологии / Я. А. Эль-Тарави, Д. К. Эрикенова, А. С. Одарченко [и др.] // Сахарный диабет. – 2023. – Т. 26. – №4. – С. 375-381.
21. Оценка распространенности хронической сердечной недостаточности у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, госпитализированных в многопрофильные стационары: результаты проспективного наблюдательного многоцентрового исследования (КРЕДО) / М. Б. Анциферов, Ж. Д. Кобалава, Т. Ю. Демидова [и др.] // Сахарный диабет. – 2024. – Т. 27. – №1. – С. 4-14.
22. Патент № 2 796 823 Российская Федерация, МПК C07K 14/435 (2006.01), C07K 19/00 (2006.01), C12N 15/62 (2006.01), C12P 21/00 (2006.01), A61K 38/17 (2006.01), A61P 3/04 (2006.01), A61P 3/10 (2006.01). Полипептид из морской анемоны *Heteractis magnifica*, ингибирующий α -амилазы млекопитающих, и его применение в качестве ингибитора α -амилаз млекопитающих, а также средства для лечения и/или профилактики постпрандиальной гипергликемии, коррекции лишнего веса и ожирения : № 2022116033: заявл. 15.06.2022: опубликовано 29.05.2023 Бюл. № 16/ Синцова О. В., Калина Р. С., Гладких И. Н., Попкова Д. В., Бороздина Н. А., Дьяченко И. А., Лейченко Е. В.; заявитель и патентообладатель ТИБОХ ДВО РАН. – 22 с.

23. Первушина Е. С. Особенности состава тела у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, получающих различную сахароснижающую терапию / Е. С. Первушина, Л. М. Давтян // Эндокринология: новости, мнения, обучение. – 2023. – Т. 12. – № 3. – С. 71-73.
24. Петунина Н. А. Сахарный диабет и ожирение. Роль агонистов рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 в лечении сахарного диабета 2 типа / Н. А. Петунина, М. Э. Тельнова // Сахарный диабет. – 2018. – Т. 21. – №4. – С. 293-300.
25. Поиск корректоров метаболических нарушений при сахарном диабете 2-го типа среди 5-замещенных бензимидазолов, содержащих во втором положении циклическую алкиламиногруппу / Н. И. Чепляева, В. А. Кузнецова, А. А. Спасов [и др.] // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2014. – №3. – С. 21-24.
26. Распространенность сахарного диабета 2 типа и других нарушений углеводного обмена в зависимости от критериев диагностики / А. В. Древаль, И. В. Мисникова, И. А. Барсуков [и др.] // Сахарный диабет. – 2010. – Т. 13. – №1. – С.116-121.
27. Регуляция метаболических процессов, опосредованная кишечной микрофлорой / Е. Н. Кравчук, А. Е. Неймарк, Е. Н. Гринева [и др.] // Сахарный диабет. – 2016. – Т. 19. – №4. – С. 280-285.
28. Романцова Т. И. Контроль сахарного диабета 2 типа: проблемы и перспективы их решения / Т. И. Романцова, И. В. Глинкина // Сахарный диабет. – 2009. – Т.12. – №4. – С. 42-46.
29. Сахарный диабет 2 типа и метаболический синдром: молекулярные механизмы, ключевые сигнальные пути и определение биомаркеров для новых лекарственных средств / И. И. Дедов, В. А. Ткачук, Н. Б. Гусев [и др.] // Сахарный диабет. – 2018. – Т. 21. – №5. – С. 364-375.
30. Свободнорадикальное окисление как патогенетическое звено метаболического синдрома / Д. А. Аникин, И. А. Соловьева, И. В. Демко [и др.] // Ожирение и метаболизм. – 2022. – 19. – № 3. – 306-316.

31. Спасов А. А. Научные подходы к комбинированной терапии сахарного диабета типа 2 / А. А. Спасов, М. В. Чепурнова // Вестник ВолГМУ. – 2011. – №1 (37). – С.8-12.
32. Спасов А. А. Сравнительная характеристика антиоксидантных свойств гипогликемических препаратов диабенола и гликлазида / А. А. Спасов, В. А. Косолапов, Н. И. Чепляева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2011. – Т. 74. – №11. – С. 14-16.
33. Титов В. Н. Резистентность к инсулину – конфликт между биологическими настройками энергетического метаболизма и образом жизни человека (взгляд на проблему с эволюционных позиций) / В. Н. Титов, В. П. Ширинский // Сахарный диабет. – 2016. – Т. 19. – №4. – С. 286-294.
34. Токмакова А. Ю. Поражения нижних конечностей при сахарном диабете / А. Ю. Токмакова, Д. Н. Егорова, Л. П. Доронина // Ожирение и метаболизм. – 2017. – Т. 14. – № 1. – С. 41-47.
35. Факторы риска и частота фатальных сердечно-сосудистых событий у пациентов с сахарным диабетом 2 типа экстремального и очень высокого риска / О. Д. Рымар, Л. В. Щербакова, С. В. Мустафина [и др.] // Эндокринология: новости, мнения, обучение. – 2023. – Т. 12. – № 4. – С. 35-41.
36. Фундаментальные основы поиска лекарственных средств для терапии сахарного диабета 2-го типа / А. А. Спасов, В. И. Петров, Н. И. Чепляева [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – Т. 68. – №2. – С. 43-49.
37. Шестакова М. В. Акарбоза в профилактике сахарного диабета типа 2 / М. В. Шестакова, О. Ю. Брескина // Сахарный диабет. – 2003. – Т. 6. – №2. – С. 38-41.
38. Экономические аспекты сахарного диабета и его осложнений / Н. П. Маколина, И. И. Клефтортова, М. Ш. Шамхалова [и др.] // Сахарный диабет. – 2008. – Т.11. – №2. – С.70-74.

39. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 / А. А. Спасов, М. П. Воронкова, Г. Л. Снигур [и др.] // БИОМЕДИЦИНА. – 2011. – Т. 1. – №3. – С. 12-18.
40. Южакова А. Е. Роль жировой ткани в поддержании гомеостаза углеводного обмена / А. Е. Южакова, А. А. Нелаева, Ю. В. Хасанова // Эффективная фармакотерапия. – 2019. – Т. 15. – №5. – С. 44-49.
41. Шишкина Н. С. Показатели липидного спектра у больных сахарным диабетом 2 типа при лечении Кардиостатином (Ловастатином) / Н. С. Шишкина, О. М. Смирнова, И. И. Дедов // Сахарный диабет. – 2005. – Vol. 8. – № 4. – Р. 22-24.
42. A-Amylase Inhibitors Are Major Components of Sea Anemone Heteractis Magnifica Mucus / O. V. Sintsova, E. V. Leychenko, I. N. Gladkikh [et al.] // Vestnik of The Far East Branch of The Russian Academy of Sciences. – 2018. – Vol. 6S. – № 202. – P. 66-66.
43. Acarbose for Postprandial Hypotension With Glucose Metabolism Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis / B. Wang, J. Zhao, Q. Zhan [et al.] // Front Cardiovasc Med. – 2021. – Vol. 8. – P. 663-635.
44. Acarbose Use and Liver Injury in Diabetic Patients With Severe Renal Insufficiency and Hepatic Diseases: A Propensity Score-Matched Cohort Study / C. T. Chao, J. Wang, J. W. Huang, K. L. Chien // Front Pharmacol. – 2018. – Vol. 9. – P. 860.
45. Activity-Based Protein Profiling of Retaining α -Amylases in Complex Biological Samples / Y. Chen, Z. Armstrong, M. Artola [et al.] // J Am Chem Soc. – 2021. – Vol. 143. – № 5. – P. 2423-2432.
46. A Direct Comparison of Metabolic Responses to High-Fat Diet in C57BL/6J and C57BL/6NJ Mice / K. H. Fisher-Wellman, T. E. Ryan, C. D. Smith [et al.] // Diabetes 1. – 2016. – Vol. 65. – № 11. – P. 3249–3261.
47. A ‘Humanized’ rat model of pre-diabetes by high fat diet-feeding to weaning wistar rats / R. M. Hafizur, S. A. Raza, S Chishti // Integr Obesity Diabetes. – 2015. – Vol. 1.

48. AICAR Improves Outcomes of Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes Induced by High-Fat Diet in C57Bl/6 Male Mice / E. A. Tukhovskaya, E. R. Shaykhutdinova, I. A. Pakhomova [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. Vol. – 23. – № 24. – P. 15719.
49. Akinlade O. M. Streptozotocin-induced type 1 and 2 diabetes in rodents: a model for studying diabetic cardiac autonomic neuropathy / O. M. Akinlade, B. V. Owoyele, A. O. Soladoye // Afr Health Sci. – 2021. – Vol. 21. – № 2. – P. 719-727.
50. Allithiamine Alleviates Hyperglycaemia-Induced Endothelial Dysfunction / A. Biró, A. Markovics, M. É. Fazekas [et al.] // Nutrients. – 2020. – Vol. 12. – № 6.
51. An IL-2 mutein engineered to promote expansion of regulatory T cells arrests ongoing autoimmunity in mice / L. Khoryati, M. N. Pham, M. Sherve [et al.] // Sci Immunol. – 2020. – Vol. 5. – № 50.
52. A Novel Dipterocarpol Derivative That Targets Alpha-Glucosidase and NLRP3 Inflammasome Activity for Treatment of Diabetes Mellitus / R. D. Danilov, I. E. Smirnova, Z. I. Galimova [et al.] // Chem. Biodiversity. – 2024. – P. e202401626.
53. Anti-diabetic effects of astaxanthin on an STZ-induced diabetic model in rats / F. Zhuge, Y. Ni, C. Wan [et al.] // Endocr J. – 2021. – Vol. 68. – № 4. – P. 451-459.
54. A Prospective, Randomized, Open-Label Study Comparing the Efficacy and Safety of Preprandial and Prandial Insulin in Combination with Acarbose in Elderly, Insulin-Requiring Patients with Type 2 Diabetes Mellitus / G. Yang, C. Li, Y. Gong [et al.] // Diabetes Technology & Therapeutics. – 2013. – Vol. 15. – № 6. – P. 513-519.
55. *Artemisia annua* L. Extracts Improved Insulin Resistance via Changing Adiponectin, Leptin and Resistin Production in HFD/STZ Diabetic Mice / M. Ghanbari, M. S. Lamuki, E. Habibi, F. Sadeghimahalli // J Pharmacopuncture. – 2022. – Vol. 25. – № 2. – P. 130-137.
56. Bailey C. Metformin: its botanical background / C. Bailey, C. Day // Pract Diabetes Int. – 2004. – Vol. 21. – № 3. – P. 115-117.

57. Ben Nejma M. Quinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from University Hospital in Tunisia / M. Ben Nejma, O. Sioud, M. Mastouri // 3 Biotech. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 1.
58. B-lymphocyte depletion with rituximab and β -cell function: two-year results / M. D. Pescovitz, C. J. Greenbaum, B. Bundy [et al.] // Diabetes Care. – 2014. – Vol. 37. – № 2. – P. 453-459.
59. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice / S. Makino, K. Kunimoto, Y. Muraoka [et al.] // Jikken Dobutsu. – 1980. – Vol. 29. – № 1. – P. 1-13. doi: 10.1538/expanim1978.29.1_1. PMID: 6995140.
60. Bromophenol and Diarylmethane Compounds: Discovery of Potent Aldose Reductase, Alpha-Amylase and Alpha-Glycosidase Inhibitors as New Therapeutic Approach in Diabetes and Functional Hyperglycemia / P. Taslimi, H. E. Aslan, Y. Demir [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2018. – Vol. 119. – P. 857-863.
61. Brunkhorst C. Characterization of maltose and maltotriose transport in the acarbose-producing bacterium *Actinoplanes* sp / C. Brunkhorst, E. Schneider // Res Microbiol. – 2005. – Vol. 156. – № 8. – P. 851-857.
62. C57BL/6J substrain differences in response to high-fat diet intervention / M.S. Siersbæk, N. Ditzel, E. K. Hejbøl [et al.] // Sci Rep 10. – 2020. – P. 14052.
63. Cellular and molecular effects of hyperglycemia on ion channels in vascular smooth muscle / M. Nieves-Cintrón, V. A. Flores-Tamez, T. Le [et al.] // Cell Mol Life Sci. – 2021. – Vol. 78. – № 1. – P. 31-61.
64. Characterization of inflammation and insulin resistance in high-fat diet-induced male C57BL/6J mouse model of obesity / D. Avtanski, V. A. Pavlov, K. J. Tracey, L. Poretsky // Animal Model Exp Med. – 2019. – Vol. 2. – P. 252–258.
65. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening / B. K. Srinivasan, L. A. Viswanad, C. L. Kaul, P. Ramarao // Pharmacol Res. – 2005. – Vol. 52. – P. 313-320.

66. Control of postprandial hyperglycemia by oral administration of the sea anemone mucus-derived α -amylase inhibitor (magnificamide) / O. Sintsova, D. Popkova, A. Kalinovskii [et al.] // Biomed Pharmacother. – 2023. – Vol. 168. – P. 115743
67. Cooper M. S. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and its role in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, metabolic syndrome, and inflammation / M. S. Cooper, P. M. Stewart // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2009. – Vol. 94. – P. 4645-4654.
68. Correlation of LUMO Localization with the α -Amylase Inhibition Constant in a Tendamistat-Based Series of Linear and Cyclic Peptides / D. L. Heyl, S. Fernandes, L. Khullar // Bioorg. Med. Chem. – 2005. – Vol. 13. – P. 4262-4268.
69. Current and future therapies for type 1 diabetes / B. J. von Scholten, F. F. Kreiner, S. C. L. Gough, M. von Herrath // Diabetologia. – 2021. – Vol. 64. – № 5. – P. 1037-1048.
70. Determination of selected microelements in polish herbs and their infusions / P. Kalny, Z. Fijałek, A. Daszczuk, P. Ostapczuk // Sci Total Environ. – 2007. – Vol. 381. – № 1-3. – P. 99-104.
71. Development of HFD-Fed/Low-Dose STZ-Treated Female Sprague-Dawley Rat Model to Investigate Diabetic Bone Fragility at Different Organization Levels / P. Sihota, R. N. Yadav, S. Poleboina [et al.] // JBMR Plus. – 2020. – Vol. 4. – № 10. – P. e10379.
72. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice / S. Lin, T. C. Thomas, L. H. Storlien, X. F. Huang // Int J Obes Relat Metab Disord. – 2000. – Vol. 24. – 5. – P. 639-646.
73. Development of insulin resistance in mice lacking PGC-1alpha in adipose tissues / S. Kleiner, R. J. Mepani, D. Laznik [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2012. – Vol. 109. – P. 9635-9640.
74. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I / M.A. Creager, T. F. Lüscher, F. Cosentino, J. A. Beckman // Circulation. – 2003. – Vol. 108. – № 12. – P. 1527-1532.

75. Diabetes Mellitus: A Path to Amnesia, Personality, and Behavior Change / R. Ahmad, K. Chowdhury, S. Kumar [et al.] // *Biology*. – 2022. – Vol. 11. – № 3. – P. 382.
76. Diabetes mellitus-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches / D. Tousoulis, N. Papageorgiou, E. Androulakis [et al.] // *J Am Coll Cardiol*. – 2013. – Vol. 62. – № 8. – P. 667-676.
77. Diabetes Mellitus-Related All-Cause and Cardiovascular Mortality in a National Cohort of Adults / S. Raghavan, J. L. Vassy, Y. L. Ho [et al.] // *J Am Heart Assoc*. – 2019. – Vol. 19. – P. e011295
78. Diabetic neuropathy / E. L. Feldman, B. C. Callaghan, R. Pop-Busui [et al.] // *Nature reviews. Disease primers*. – 2019. – Vol. 5. – № 1. – P. 41.
79. Diabetic neuropathy in older adults / A. I. Vinik, E. S. Strotmeyer, A. A. Nakave, C. V. Patel // *Clinics in geriatric medicine*. – 2008. – Vol. 24. – №3. – P. 407-v.
80. Diet-induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) gene / A. Nicholson, P. C. Reifsnyder, R. D. Malcolm [et al.] // *Obesity (Silver Spring)*. – 2010. – Vol. 18. – №10. – P. 1902-5.
81. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes / Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group, H. C. Gerstein, M. E. Miller [et al.] // *N Engl J Med*. – 2008. – Vol. 358. – № 24. – P. 2545-2559.
82. Effects of 24-week treatment with acarbose on glucagon-like peptide 1 in newly diagnosed type 2 diabetic patients: a preliminary report / M. Y. Zheng, J. H. Yang, C. Y. Shan [et al.] // *Cardiovascular diabetology*. – 2013. – Vol 12. – № 73.
83. Elevated Glucose Levels Promote Contractile and Cytoskeletal Gene Expression in Vascular Smooth Muscle via Rho/Protein Kinase C and Actin Polymerization / T. T. Hien, K. M. Turczyńska, D. Dahan [et al.] // *J Biol Chem*. – 2016. – Vol. 291. – № 7. – P. 3552-68.
84. Elhalis H. Soybean fermentation: Microbial ecology and starter culture technology / H. Elhalis, X. H. Chin, Y. Chow // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 0:0. – 2023. – Vol. 366. – № 1. – P. 1-23.

85. Emerging Targets in Type 2 Diabetes and Diabetic Complications / S. Demir, P. Nawroth, S. Herzig, B. Ekim Üstünel // Adv Sci (Weinh). – 2021. – Vol. 8. – № 18. – P. e2100275.
86. Epigenetic phenomena linked to diabetic complications / L. Pirola, A. Balcerczyk, J. Okabe, A. El-Osta // Nat Rev Endocrinol. – 2010. – Vol. 6. – № 12. – P. 665-675.
87. Evaluation of the value of conventional and unconventional lipid parameters for predicting the risk of diabetes in a non-diabetic population / G. Sheng, M. Kuang, R. Yang [et al.] // J Transl Med. – 2022. – Vol. 20. – № 1. – P. 266.
88. Exploring New Drug Targets for Type 2 Diabetes: Success, Challenges and Opportunities / A. Kanwal, N. Kanwar, S. Bharati [et al.] // Biomedicines. – 2022. – Vol. 10. – P. 331.
89. Ferrari F. Hyperglycemia in acute ischemic stroke: physiopathological and therapeutic complexity / F. Ferrari, A. Moretti, R. F. Villa // Neural Regen Res. – 2022. – Vol. 17. – № 2. – P. 292-299.
90. First echinoderm alpha-amylase from a tropical sea cucumber (*Holothuria leucospilota*): Molecular cloning, tissue distribution, cellular localization and functional production in a heterogenous E.coli system with codon optimization / X. Wu, Y. Ruan, T. Chen [et al.] // PLoS One. – 2020. – 15. – № 9. – e0239044.
91. First Trimester Plasma Glucose Values in Women without Diabetes are Associated with Risk for Congenital Heart Disease in Offspring / E. I. T. Helle, P. Biegley, J. W. Knowles [et al.] // J Pediatr. – 2018. – Vol. 195. – P. 275-278.
92. Fournier A. Diagnosing diabetes. A practitioner's plea: keep it simple / A. Fournier // Journal of general internal medicine. – 2000. – Vol. 15. – № 8. – P. 603-604.
93. Free fatty acid receptors as therapeutic targets for the treatment of diabetes / A. Ichimura, S. Hasegawa, M. Kasubuchi [et al.]. // Front Pharmacol. – 2014. – Vol. 5. – P. 236.

94. Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis / Z. L. Teo, Y. C. Tham, M. Yu [et al.] // *Ophthalmology*. – 2021. – Vol. 128. – № 11. – P. 1580-1591.
95. Glycated hemoglobin and the risk of kidney disease and retinopathy in adults with and without diabetes / E. Selvin, Y. Ning, M. W. Steffes [et al.] // *Diabetes*. – 2011. – Vol. 60. – № 1. – P. 298-305.
96. Heydemann A. An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus / A. Heydemann // *J Diabetes Res*. – 2016. – 2016. – P.
97. High-fat diet and streptozotocin in the induction of type 2 diabetes mellitus: a new proposal / D. A. Magalhães, W. T. Kume, F. S. Correia [et al.] // *An Acad Bras Cienc*. – 2019. – Vol. 91. – № 1. – P. e20180314.
98. High-fat diet in a mouse insulin-resistant model induces widespread rewiring of the phosphotyrosine signaling network / A. Dittmann, N. J. Kennedy, N. L. Soltero [et al.] // *Mol Syst Biol*. – 2019. – Vol. 15. – № 8. – P. e8849.
99. High-fat diet-induced diabetes leads to vascular alterations, pericyte reduction, and perivascular depletion of microglia in a 6-OHDA toxin model of Parkinson disease / O. F. Elabi, J. P. M. C. M. Cunha, A. Gaceb [et al.] // *Journal of Neuroinflammation*. – 2021. – Vol. 18. – № 1. – P. 175.
100. Hofmann O. The Primary Structure of α -Amylase Inhibitor Z-2685 from *Streptomyces Parvullus* FH-1641 / O. Hofmann, L. Vértessy, G. Braunitzer // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. – 1985. – Vol. 366. – P. 1161-1168.
101. Hyperglycemia Enhances Constriction of Retinal Venules via Activation of the Reverse-Mode Sodium-Calcium Exchanger / Y.L. Chen, W. Xu, R. H. Jr. Rosa [et al.] // *Diabetes*. – 2019. – Vol. – 68. – № 8. – P. 1624-1634.
102. Identification of Bioactive Peptides with α -Amylase Inhibitory Potential from Enzymatic Protein Hydrolysates of Red Seaweed (*Porphyra* spp) / H. Admassu, M. A. A. Gasmalla, R. Yang, W. Zhao // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2018. – Vol. 66. – № 19. – P. 4872-4882.

103. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 / N. H. Cho, J. E. Shaw, S. Karuranga [et al.] // *Diabetes Res Clin Pract.* – 2018. – Vol. 138. – P. 271-281.
104. Inhibition of enzymic digestion of amylose by free fatty acids in vitro contributes to resistant starch formation / T. C. Crowe, S. A. Seligman, L. Copeland // *J Nutr.* – 2000. – Vol. 130. – №8. – P.2006-8.
105. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes / ADVANCE Collaborative Group, A. Patel, S. MacMahon [et al.] // *N Engl J Med.* – 2008. – Vol. 358. – № 24. – P. 2560-2572.
106. Interleukin-21 is critically required in autoimmune and allogeneic responses to islet tissue in murine models / H. M. McGuire, S. Walters, A. Vogelzang [et al.] // *Diabetes.* – 2011. – Vol. 60. – № 3. – P. 867-875
107. Kang S. Nuclear Mechanisms of Insulin Resistance / S. Kang, L. T. Tsai, E. D. Rosen // *Trends Cell Biol.* – 2016. – Vol. 26. – P. 341-351.
108. Kaspar A. A. Future directions for peptide therapeutics development / A. A. Kaspar, J. M. Reichert // *Drug Discov Today.* – 2013. – Vol. 18. – № 17-18. – P. 807-17.
109. Khalili N. Evaluation of the Effects of Acarbose on Weight and Metabolic, Inflammatory, and Cardiovascular Markers in Patients with Obesity and Overweight / N. Khalili, A. Safavipour // *Int J Prev Med.* – 2020. – Vol. 11. – P. 140.
110. Kitamura H. Effects of Propolis Extract and Propolis-Derived Compounds on Obesity and Diabetes: Knowledge from Cellular and Animal Models / H. Kitamura // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24. – № 23.
111. Kunhiraman B. P. Potential cardiovascular benefits of insulin sensitizers / B. P. Kunhiraman, A. Jawa, V. A. Fonseca // *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* – 2005. – Vol. 34. – P. 117-135.
112. Lechner J. The pathology associated with diabetic retinopathy / J. Lechner, O. E. O'Leary, A. W. Stitt // *Vision Res.* – 2017. – Vol. 139. – P. 7-14.

113. Loss of FFA2 and FFA3 increases insulin secretion and improves glucose tolerance in type 2 diabetes / C. Tang, K. Ahmed, A. Gille [et al.] // *Nat. Med.* – 2015. – Vol. 21. – P. 173-177.
114. Magnificamide, a β -Defensin-Like Peptide from the Mucus of the Sea Anemone *Heteractis magnifica*, Is a Strong Inhibitor of Mammalian α -Amylases / O. Sintsova, I. Gladkikh, A. Kalinovskii [et al.] // *Marine Drugs*. – 2019. – Vol. 17. – № 10. – P. 542.
115. Malviya N. Antidiabetic potential of medicinal plants / N. Malviya, S. Jain, S. Malviya // *Acta Pol Pharm.* – 2010. – Vol. 67. – № 2. – P. 113-118.
116. Marine Organisms as a Rich Source of Biologically Active Peptides / M. W. F. S. Macedo, N. B. D. Cunha, J. A. Carneiro [et al.] // *Frontiers in Marine Science*. – 2021. – Vol. 8.
117. Marles R. J. Antidiabetic plants and their active constituents / R. J. Marles, N. R. Farnsworth // *Phytomedicine*. – 1995. – Vol. 2. – № 2. – P. 137-189.
118. McCarty M. F. Acarbose, lente carbohydrate, and prebiotics promote metabolic health and longevity by stimulating intestinal production of GLP-1 / M. F. McCarty, J. J. DiNicolantonio // *Open Heart*. – 2015. – Vol. 2. – P. e000205.
119. Metabolic Syndrome Is Associated with Oxidative Stress and Proinflammatory State / M. Monserrat-Mesquida, M. Quetglas-Llabrés, X. Capó [et al.] // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9. – P. 236.
120. Metformin and Insulin Resistance: A Review of the Underlying Mechanisms behind Changes in GLUT4-Mediated Glucose Transport / R. Herman, N. A. Kravos, M. Jensterle [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2022. – Vol. 23. – № 3. – P. 1264.
121. Metformin combined with acarbose vs. single medicine in the treatment of type 2 diabetes: A meta-analysis / Z. Liu, X. Zhao, W. Sun [et al.] // *Exp Ther Med*. – 2017. – Vol. 13. – № 6. – P. 3137-3145.
122. Microvascular complications at time of diagnosis of type 2 diabetes are similar among diabetic patients detected by targeted screening and patients newly diagnosed in general practice: the hoorn screening study / A. M. Spijkerman, J. M. Dekker, G. Nijpels [et al.] // *Diabetes Care*. – 2003. – Vol. 26. – 9. – P. 2604-2608.

123. Microvascular dysfunction: a potential pathophysiological role in the metabolic syndrome / E. H. Serné, R. T. de Jongh, E. C. Eringa [et al.] // Hypertension. – 2007. – Vol. 50. – № 1. – P. 204-211.
124. Molecular evolution of dimeric alpha-amylase inhibitor genes in wild emmer wheat and its ecological association / J. R. Wang, Y. M. Wei, X. Y. Long [et al.] // BMC Evol Biol. – 2008. – Vol. 8. – № 91.
125. Moller D. E. Metabolic Disease Drug Discovery – “Hitting the Target” Is Easier Said Than Done / D. E. Moller // Cell Metab. – 2012. – Vol. 15. – P. 19-24.
126. Nair A. B. A simple practice guide for dose conversion between animals and human / A. B. Nair, S. Jacob // J Basic Clin Pharm. – 2016. – Vol. 7. – № 2. – P. 27-31.
127. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants / G. Danaei, M. M. Finucane, Y. Lu [et al.] // Lancet. – 2011. – Vol. 378. – P. 31-40.
128. Nauck, M. Incretin therapies: Highlighting common features and differences in the modes of action of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors / M. Nauck // Diabetes Obes. Metab. – 2016. – Vol. 18. – P. 203-216.
129. Nguyen N. D. T. Targeted proteins for diabetes drug design / N. D. T. Nguyen, L. T. Le // Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol. – 2012. – Vol. 3. – P. 013001.
130. Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: an industry perspective / J. G. Moffat, F. Vincent, J. Lee [et al.] // Nat. Rev. Drug Discov. – 2017. – Vol. 16. – P. 531-543.
131. Oxidative stress and antioxidant defense / E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen [et al.] // World Allergy Organ J. – 2012. – Vol. 5. – № 1. – P. 9-19.
132. Pandey S. Future Perspective of Diabetic Animal Models / S. Pandey, M. C. Dvorakova // Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. – 2020. – Vol. 20. – № 1. – P. 25-38.

133. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus / U. Galicia-Garcia, A. Benito-Vicente, S. Jebari [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 17. – P. 6275.
134. Phytochemical Profiling in Conjunction with In Vitro and In Silico Studies to Identify Human α -Amylase Inhibitors in *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit for the Treatment of Diabetes Mellitus / S. Renganathan, S. Manokaran, P. Vasanthakumar [et al.] // *ACS Omega*. – 2021. – Vol. 6. – № 29. – P. 19045-19057.
135. Pilacinski S. Influence of lifestyle on the course of type 1 diabetes mellitus / S. Pilacinski, D. A. Zozulinska-Ziolkiewicz // *Arch. Med. Sci.* – 2014. – Vol. 10. – P. 124-134.
136. PGC-1 α , glucose metabolism and type 2 diabetes mellitus / H. Wu, X. Deng, Y. Shi [et al.] // *J Endocrinol.* – 2016. – Vol. 229. – 3. – P. R99-R115.
137. Potent Human α -Amylase Inhibition by the β -Defensin-like Protein Helianthamide / C. Tysoe, L. K. Williams, R. Keyzers [et al.] // *ACS Cent Sci.* – 2016. – Vol. 2. – № 3. – P. 154-161.
138. Prevalence, Patterns and Predictors of Chronic Complications of Diabetes Mellitus at a Large Referral Hospital in Ethiopia: A Prospective Observational Study / T. Sheleme, G. Mamo, T. Melaku, T. Sahilu // *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*. – 2020. – Vol. 13. – 4909-4918.
139. Preliminary studies on acute and subacute toxicity of an antidiabetic herbal preparation / S. Mutalik, B. Sulochana, M. Chetana [et al.] // *Dianex. Indian J Exp Biol.* – 2003. – Vol. 41. – № 4. – P. 316-320.
140. Proteinaceous α -amylase inhibitors: purification, detection methods, types and mechanisms / H. Li, H. Zhou, J. Zhang [et al.] // *International Journal of Food Properties*. – 2021. – Vol. 24. – № 1. – P. 277-290.
141. Proteinaceous Alpha-Amylase Inhibitor from *Moringa Oleifera* Leaf Extract: Purification, Characterization, and Insecticide Effects against *C. maculatus* Insect Larvae / A. Karray, M. Alonazi, R. Jallouli [et al.] // *Molecules*. – 2022. – 27. – № 13. – 4222.

142. Relation between fasting glucose and retinopathy for diagnosis of diabetes: three population-based cross-sectional studies / T. Y. Wong, G. Liew, R. J. Tapp [et al.] // *Lancet*. – 2008. – Vol. 371. – № 9614. – P. 736-43.
143. Rosak C. Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: patient considerations / C. Rosak, G. Mertes // *Diabetes Metab Syndr Obes*. – 2012. – Vol. 5. – P. 357-367.
144. Rosak C. Effects of acarbose on proinsulin and insulin secretion and their potential significance for the intermediary metabolism and cardiovascular system / C. Rosak, G. Mertes // *Curr Diabetes Rev*. – 2009. – Vol. 5. – 3. – P. 157-164.
145. Rui L. Energy metabolism in the liver / L. Rui // *Compr. Physiol*. – 2014. – Vol. 4. – P. 177-197.
146. Ruiz-Ruiz F. Marine-Derived Bioactive Peptides for Biomedical Sectors: A Review / F. Ruiz-Ruiz, E. I. Mancera-Andrade, H. M. Iqbal // *Protein Pept Lett*. – 2017. – Vol. 24. – № 2. – P. 109-117.
147. Saxena L. Purification of a Bifunctional Amylase/Protease Inhibitor from Ragi (Eleusine Coracana) by Chromatography and Its Use as an Affinity Ligand / L. Saxena, B. K. Iyer, L. Ananthanarayan // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*. – 2010. – Vol. 878. – P. 1549-1554.
148. Schleicher E. D. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy / E. D. Schleicher, C. Weigert // *Kidney Int*. – 2000. – Vol. 58. – P. S13-S18.
149. Serum Ccn3 levels are increased in type 2 diabetes mellitus and associated with obesity, insulin resistance and inflammation / J. Y. Li, Y. D. Wang, X. Y. Qi. [et al.] // *Clin. Chim. Acta*. – 2019. – Vol. 494. – P. 52-57.
150. Shrivastava S. R. Role of self-care in management of diabetes mellitus / S. R. Shrivastava, P. S. Shrivastava, J. Ramasamy // *J. Diabetes Metab. Disord*. – 2013. – Vol. 12. – P. 14.
151. Skeletal muscle protein tyrosine phosphatase 1B regulates insulin sensitivity in African Americans / A. J. Stull, Z. Q. Wang, X. H. Zhang [et al.] // *Diabetes*. – 2012. – Vol. 61. – 1415-1422.

152. Stehouwer C. D. A. Microvascular Dysfunction and Hyperglycemia: A Vicious Cycle With Widespread Consequences / C. D. A. Stehouwer // *Diabetes*. – 2018. – Vol. – 67. – № 9. – P. 1729-1741.
153. Suryavanshi S.V. NF- κ B: A Potential Target in the Management of Vascular Complications of Diabetes / S. V. Suryavanshi, Y. A. Kulkarni // *Front Pharmacol*. – 2017. – Vol. 8. – P. 798.
154. The anti-diabetic effects of NAG-1/GDF15 on HFD/STZ-induced mice / P. Lertpatipanpong, J. Lee, I. Kim [et al.] // *Sci Rep* 11. – 2021. – P. 15027.
155. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model / M. Zhang, X. Y. Lv, J. Li [et al.] // *Exp Diabetes Res*. – 2008. – Vol. 2008. – P.
156. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications / F. A. Matough, S. B. Budin, Z. A. Hamid [et al.] // *Sultan Qaboos Univ Med J*. – 2012. – Vol. 12. – № 1. – P. 5-18
157. The role of glucocorticoid receptors in metabolic syndrome and psychiatric illness / A. G. Moraitis, T. Block, D. Nguyen, J. K. Belanoff // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. – 2017. – Vol. 165. – Pt A. – P. 114-120.
158. The Combinatorial Library of Actinoporins from The Sea Anemone *Heteractis Crispa* / E. V. Leychenko, M. P. Isaeva, E. S. Tkacheva [et al.] // *Vestnik of The Far East Branch of The Russian Academy of Sciences*. – 2018. – Vol. 6S. – № 202. – P. 48-49.
159. The Sound of Silence: Activating Silent Biosynthetic Gene Clusters in Marine Microorganisms / F. J. Reen, S. Romano, A. D. Dobson, F. O'Gara // *Mar Drugs*. – 2015. – Vol. 13. – № 8. – P.4754-83.
160. Tomic D. The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus. *Nature reviews* / D. Tomic, J. E. Shaw, D. J. Magliano // *Endocrinology*. – 2022. – Vol. 18. – № 9. – P. 525-539.
161. Transcription Factor NRF2 as a Therapeutic Target for Chronic Diseases: A Systems Medicine Approach / A. Cuadrado, G. Manda, A. Hassan [et al.] // *Pharm. Rev*. – 2018. – Vol. 70. – P. 348-383.

162. Tykocki N. R. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles / N. R. Tykocki, E. M. Boerman, W. F. Jackson // *Compr Physiol.* – 2017. – Vol. 16. – P. 485-581.
163. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs / A. Artasensi, A. Pedretti, G. Vistoli, L. Fumagalli // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25. – № 8. – P. 1987.
164. van Stee M. F. Actions of metformin and statins on lipid and glucose metabolism and possible benefit of combination therapy / M. F. van Stee, A. A. de Graaf, A. K. Groen // *Cardiovasc Diabetol.* – 2018. – Vol. 17. – № 1. – P. 94
165. Wahab A. Difficulties in Treatment and Management of Epilepsy and Challenges in New Drug Development / A. Wahab // *Pharmaceuticals (Basel).* – 2010. – Vol. 3. – № 7. – P. 2090-2110.
166. Weber H. C. Overview of gastrointestinal regulatory peptides / H. C. Weber // *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity.* – 2016. – Vol. 23. – № 1. – P. 1-2.
167. Wickramasinghe A. S. D. Biochemical characterization of high fat diet fed and low dose streptozotocin induced diabetic Wistar rat model / A. S. D. Wickramasinghe, A. P. Attanayake, P. Kalansuriya // *J Pharmacol Toxicol Methods.* – 2022. – Vol. 113. – P. 107144.
168. Williams A.S. The extracellular matrix and insulin resistance / A. S. Williams, L. Kang, D. H. Wasserman // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2015. – Vol. 26. – P. 357–366.
169. Worel J. N. Preventing Cardiovascular Disease in Patients With Diabetes: New Evidence Informs Changes in Standards of Care / J. N. Worel, L. L. Hayman // *J Cardiovasc Nurs.* – 2016. – Vol. 31. – № 3. – P. 198-200.
170. Xie F. Precision medicine in diabetes prevention, classification and management / F. Xie, J. C. Chan, R. C. Ma // *J Diabetes Investig.* – 2018. – Vol. 9. – № 5. – P. 998-1015.
171. Yoon S. H. Study of the inhibition of four alpha amylases by acarbose and its 4IV-alpha-maltohexaosyl and 4IV-alpha-maltododecaosyl analogues / S. H. Yoon, J. F. Robyt // *Carbohydr Res.* – 2003. – Vol. 338. – № 19. – P. 1969-80.

172. Zeldin D. C. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism / D. C. Zeldin // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276. – P. 36059-36062.
173. Zhang Q. Microbial α -amylase: A biomolecular overview / Q. Zhang, Y. Han, H. Xiao // Process Biochemistry. – 2017. – Vol. 53. – P. 88-101.
174. Zhu Q. Oral delivery of proteins and peptides: Challenges, status quo and future perspectives / Q. Zhu, Z. Chen, P. K. Paul // Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2021. – Vol. 11. – № 8. – P. 2416-2448.