

ВЛИЯНИЕ НОВОГО АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА GPR119 СОЕДИНЕНИЯ ZB-16 НА КОАГУЛЯЦИОННЫЙ ГЕМОСТАЗ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Д. В. Куркин¹, Е. В. Волотова¹, Д. А. Бакулин¹, М. А. Шафеев², И. Н. Тюренков¹

¹Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармакологии и биофармации ФУВ

²ЗАО «Исследовательский Институт Химического Разнообразия», г. Химки, Московская обл.

В работе показано влияние агониста рецептора GPR119 на уровень гликемии и коагуляционный гемостаз при экспериментальном сахарном диабете. Была проведена оценка плазменного (коагуляционного) гемостаза у животных с экспериментальным сахарным диабетом типа 2. При 4-недельном пероральном введении соединения ZB-16 у животных значимо по отношению к контролю снижался уровень глюкозы, а также улучшались показатели коагуляционного гемостаза: нормализовалось АЧТВ, протромбиновое и тромбиновое время, а также содержание фибриногена.

Ключевые слова: сахарный диабет, GPR119, ситаглиптин, гемостаз, АЧТВ, ПВ, фибриноген.

THE INFLUENCE OF NOVEL GPR119 RECEPTOR AGONIST ZB-16 ON HEMOSTASIS IN DIABETIC RATS

D. V. Kurkin¹, E. V. Volotova¹, D. A. Bakulin¹, M. A. Chafeev², I. N. Tyurenkov¹

¹Volgograd State Medical University, Department for Pharmacology and Biopharmacy,
Volgograd, Russian Federation,

²Chemical Diversity Research Institute, Khimki, Russian Federation

The paper showed the effect of GPR119 agonist on the glycemic level in experimental diabetes and coagulation hemostasis. We evaluated the plasma (coagulation) hemostasis in experimental animals with type 2 diabetes. After 4-week oral administration of ZB-16 the animals showed a significant decrease in blood glucose as compared to the controls and improved coagulation hemostasis: normalized APTT, prothrombin and thrombin time and fibrinogen.

Key words: Diabetes mellitus, GPR119, sitagliptin, hemostasis, APTT, PT, fibrinogen.

Численность больных сахарным диабетом (СД) типа 2 в мире за последние 10 лет увеличилась более чем в 2 раза и в настоящее время достигла 415 млн человек, включая около 193 млн недиагностированных случаев. Согласно прогнозам Международной диабетической федерации к 2040 году сахарным диабетом будет страдать 642 млн человек [10].

Ведущей причиной смертности и инвалидизации при СД типа 2 являются его сердечно-сосудистые осложнения. Основными причинами которых являются инсулинорезистентность, эндотелиальная дисфункция, гипертриглицеридемия, оксидативный стресс, атеросклероз и нарушения в системе гемостаза, формирующие протромботическое состояние крови. Нарушения в системе коагуляционного гемостаза и фибринолиза при СД типа 2 заключаются в повышении активности тромбина и факторов VIII/vWf, VII и X, увеличении концентрации фибриногена, приводящем к укорочению времени тромбообразования; повышению уровня ингибитора активатора плазминогена 1 (PAI-1), который замедляет процесс фибринолиза. По мере прогрессирования заболевания нарушения в системах коагуляции и фибринолиза способствуют развитию макро- и микрососудистых осложнений у пациента (инфаркт миокарда, инсульт, ретино-, нефро-, нейропатии и др.) [2, 3, 5].

В качестве базовой терапии СД типа 2, наряду с бигуанидами и производными сульфонилмочевины, все чаще используются средства, влияющие на систему инкретинов: ингибиторы ДПП-4 (Ситаглиптин, Вилдаглиптин, Саксаглиптин, Линаглиптин, Алоглиптин, Ликсисенатид и Госоглиптин) и синтетические аналоги ГПП-1 (Эксенатид, Лираглутид, Ликсисенатид и не зарегистрированные в РФ Эксенатид LAR, Дулаглутид, Альбиглутид и Таспоглутид) [1, 9]. Интерес к данной группе противодиабетических препаратов не случаен, помимо высокой эффективности и безопасности, они обладают рядом плейотропных эффектов в отношении сердечно-сосудистой системы: замедление атеросклеротического процесса, снижение апоптоза эндотелиоцитов и кардиомиоцитов [6, 9]. Основой для плейотропного действия инкретиномиметиков является физиологическая способность ГПП-1 снижать уровень экспрессии некоторых молекул адгезии (VCAM-1 и ICAM-1) и провоспалительных цитокинов (MCP-1 и FНО- α), снижать уровень PAI-1 [6, 9].

Отмечено, что физиологическая секреция ГПП-1 при СД типа 2 снижается, в то время как чувствительность к нему сохраняется. Напротив, секреция ГИП остается неизменной, но чувствительность к нему резко снижена. До недавнего времени, фармакологический подход, заключающийся в стимуляции секреции соб-

ственных инкретинов еще не был реализован. С открытием ряда рецепторов, локализованных в первую очередь на энтероэндокринных клетках (GPR40, GPR41, GPR43, GPR119, GPR120 и др.), оказалась возможной фармакологическая регуляция секреции эндогенных инкретинов. В настоящее время агонист GPR40 (фасиглифам) находится на 3-й фазе клинических исследований, из агонистов GPR119 3 находятся на 2-й и 2 агониста на 1-й фазах клинических исследований [7, 8, 12]. Что говорит о стимуляции секреции эндогенных инкретинов как о признанном фармакологическом подходе в лечении СД типа 2.

Тем не менее, на настоящий момент проведено недостаточно исследований по изучению влияния средств, стимулирующих секрецию инкретинов, на состояние гемостаза у животных с СД. Тогда как известно, что нормализация гликемии и основных параметров гемостаза при проведении противодиабетической терапии может свидетельствовать не только о компенсации углеводного обмена, но и о снижении риска развития макро- и микрососудистых осложнений у пациента.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение влияния нового агониста GPR119 рецептора — соединения ZB-16 — на плазменный (коагуляционный) компонент гемостаза у животных с экспериментальным сахарным диабетом.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Субстанция соединения ZB-16 синтезирована ЗАО «Исследовательский Институт Химического Разнообразия» (г. Химки, Россия) и представляет собой высокоактивный ($IC_{50} = 7$ нМ) селективный агонист рецептора GPR119.

Исследование выполнено на 50 половозрелых крысах-самках (возраст 6 мес., масса 240—260 г), с экспериментальным сахарным диабетом (ЭСД) типа 2. ЭСД моделировали однократным внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (Sigma-Aldrich, США) 65 мг/кг на фоне предварительного (за 15 минут) введения никотинамида (Sigma-Aldrich, США) 230 мг/кг [4]. После определения уровня гликемии (спустя 72 часа) были сформированы 4 экспериментальные группы ($n = 10$) из животных с уровнем глюкозы натощак 8—14 ммоль/л. Параллельно формировалась группа из 10 интактных животных того же возраста, веса и пола. Уровень глюкозы определялся в крови глюкометром Контур ТС (Bayer, Германия).

Исследуемое соединение изучалось в двух эффективных дозах (0,1 и 1 мг/кг), отобранных по результатам предыдущих исследований. В качестве препарата сравнения использовали ингибитор ДПП-4 ситаглиптин («Янувия», «Мерк Шарп и Доум Б.В.», Германия) как наиболее близкий по механизму действия в дозе 10 мг/кг, подобранной в соответствии с данными литературы [11].

Субстанцию соединения ZB-16 вводили в течение 28 дней один раз в сутки, внутрижелудочно через зонд в виде суспензии, дисперсионной средой служила вода очищенная (объем введенной жидкости на одно животное составлял 0,1 мл на 100 г живой массы). Препарат сравнения и воду вводили в эквивалентном объеме. На 7-й, 14-й, 21-й и 28-й дни после начала лечения у животных оценивался тощаковый уровень глюкозы, затем проводили забор крови для определения параметров коагуляционного гемостаза.

Изучение коагуляционного звена гемостаза.

Определение показателей гемостаза осуществлялось на программируемом опτικο-механическом коагулометре «Минилаб 701» с использованием наборов (НПО РЕНАМ, Россия) для определения активированного частичного тромбопластинового (АЧТВ), протромбинового (ПВ) и тромбинового времени (ТВ), а также концентрацию фибриногена в крови. Забор крови у животных производили из брюшной аорты.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием Prism 5 (GraphPad Software Inc., США). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. В зависимости от типа распределения использовали непараметрические (критерии Краскела-Уоллиса, Ньюмена-Кейлса) и параметрические методы статистического анализа (критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони). Значения $p < 0,05$ расценивались как статистически значимые.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень тощаковой гликемии до лечения не отличался у животных всех экспериментальных групп и составлял от 8 до 14 ммоль/л. Введение исследуемого соединения в дозе 1 мг/кг в течение 4 недель животным с ЭСД способствовало снижению уровня глюкозы в крови до уровня сопоставимого с таковым у получавших ситаглиптин. Наиболее выраженный сахароснижающий эффект исследуемое соединение ZB-16 оказывало в дозе 1 мг/кг (табл.).

В плазменном (коагуляционном) механизме свертывания крови, итогом которого является образование фибрина, основная роль принадлежит плазменным факторам (фибриноген, протромбин и др.).

Первая фаза плазменного гемостаза — образование протромбиназы. Показателем, характеризующим первую фазу плазменного гемостаза, является активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) [3, 5].

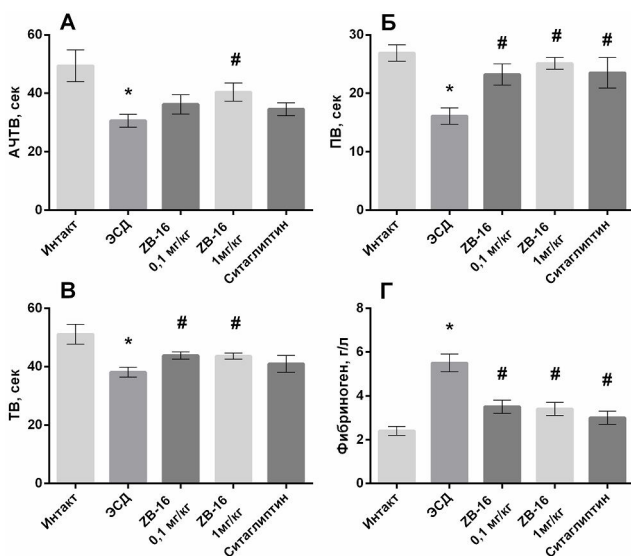
По результатам проведенного исследования в группе животных с ЭСД наблюдается достоверное ($p < 0,05$) снижение АЧТВ на 38 % по отношению к группе интактных животных, что свидетельствует о нарушениях в системе внутреннего каскада свертывания плазмы (рис. А).

Уровень гликемии у животных с сахарным диабетом, получавших лечение в течение 4 недель, ммоль/л и отклонение от уровня гликемии до лечения (%)

Группа/время наблюдения	Время после начала лечения, сут				
	0	7	14	21	28
Интакт	4,1 ± 0,1 (0)	4,4 ± 0,2 (7)	4,2 ± 0,3 (2)	4,1 ± 0,1 (0)	3,7 ± 0,2 (-10)
ЭСД	13,6 ± 1,0 [*] (0)	10,9 ± 0,7 (-20)	10,5 ± 0,7 (-23)	9,8 ± 0,8 (-28)	9,6 ± 0,5 (-29)
ZB-16 0,1, мг/кг	13,1 ± 0,9 (0)	10,8 ± 0,7 (-18)	9,9 ± 0,7 (-24)	9,0 ± 0,5 (-31)	8,4 ± 0,5 [#] (-36)
ZB-16 1, мг/кг	13,4 ± 0,6 0	10,4 ± 0,9 (-22)	9,4 ± 0,7 (-30)	8,4 ± 0,5 [#] (-37)	7,9 ± 0,4 (-41)
Ситаглиптин	12,8 ± 0,6 (0)	10,1 ± 0,6 (-21)	9,2 ± 0,5 (-28)	8,1 ± 0,4 (-37)	7,5 ± 0,5 [#] (-41)

Примечание. ЭСД — группа животных с экспериментальным пред-диабетом без лечения.

*Достоверно по отношению к группе интактных животных ($p < 0,05$); #достоверно по отношению к группе ЭСД ($p < 0,05$).



ЭСД — группа животных с экспериментальным сахарным диабетом без лечения; Интакт — интактная группа животных.

*Различия статистически значимы по отношению к группе интактных животных ($p < 0,05$); #различия статистически значимы по отношению к группе животных с ЭСД ($p < 0,05$).

Рис. Основные показатели гемостаза у животных с сахарным диабетом после 4-недельного введения исследуемого соединения и ситаглиптина.

А — АЧТВ; Б — протромбиновое время; В — тромбиновое время; Г — уровень фибриногена

В группе животных, получавших исследуемое соединение и препарат сравнения (ситаглиптин), наблюдалось удлинение АЧТВ, так, при применении ZB-16 в дозе 1 мг/кг на 31,8 % ($p < 0,05$), в дозе 0,1 мг/кг на 18 %, ситаглиптина на 12,8 % соответственно, по отношению к группе животных с ЭСД без лечения. Таким образом, наиболее выраженное действие на данный показатель наблюдалось у ZB-16 в дозе 1 мг/кг.

Вторая фаза плазменного гемостаза — тромбинообразование. В эту фазу протромбиназа вместе с факторами коагуляции V, VII, X и IV переводит неактивный протромбин в активную форму — тромбин. Показателем, характеризующим вторую фазу, является протромбиновое время (ПВ) [3, 5].

У группы животных с ЭСД по сравнению с группой интактных отмечается достоверное ($p < 0,05$) снижение протромбинового времени на 40 %, что свидетельствует о снижении антикоагуляционного потенциала.

Исследуемое соединение повышало значения ПВ на 44 % (в дозе 0,1 мг/кг) ($p < 0,05$), на 55 % (в дозе 1 мг/кг) ($p < 0,05$) соответственно, по отношению к группе животных с ЭСД без лечения (рис. Б.). Препарат сравнения уступал по выраженности действия исследуемому соединению в дозе 1 мг/кг (рис. Б.).

Третья фаза — фибринообразование. Показателем, характеризующим третью фазу, является тромбиновое время и концентрация фибриногена в плазме [3, 5].

Тромбиновое время характеризует конечный этап процесса свертывания — превращение фибриногена в фибрин под действием тромбина.

В условиях сахарного диабета и развивающейся на его фоне эндотелиальной дисфункции наблюдается достоверное ($p < 0,05$) укорочение тромбинового времени (ТВ) у животных с ЭСД без фармакологической поддержки на 25,4 %, по сравнению с интактными, что также свидетельствует об усилении прокоагуляционных сдвигов в системе гемостаза. Под влиянием исследуемого соединения (в равной степени при использовании его в дозе 0,1 и 1 мг/кг) происходит достоверное удлинение ТВ (рис. В).

В группе животных с ЭСД наблюдалось достоверное увеличение уровня фибриногена в плазме крови на 124,9 % ($p < 0,05$) по сравнению с группой интактных животных, что подтверждает наличие нарушений в системе плазменного гемостаза (повышение образования сгустка фибрина на последней стадии свертывания кро-

ви) (рис. Г). Концентрация фибриногена является одним из показателей, характеризующих третью фазу образования тромба — фибринообразование. Кроме того, фибриноген является одним из белков «острой фазы», концентрация которых повышается при нарушениях системы гемостаза и острых воспалениях.

У группы животных с ЭСД, получавшей в качестве лечения субстанцию соединения ZB-16 в дозах 0,1 и 1 мг/кг, концентрация фибриногена составила $(3,5 \pm 0,7)$ и $(3,4 \pm 0,7)$ г/л ($p < 0,05$) соответственно, что было достоверно меньше (на 36,8 и 38,3%), чем в группе животных с ЭСД без лечения. Препарат сравнения оказывал менее выраженный эффект (рис. Г).

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о нормализации показателей гемостаза у животных с СД типа 2, получавших в течение 4 недель соединения ZB-16 и ситаглиптин.

Достижение нормогликемии в клинике приводит к реальному улучшению состояния гемостаза, однако это не обеспечивает полного восстановления его нарушений, возникающих с формированием инсулинорезистентности [3]. Некоторые существующие гипогликемические препараты оказывают влияние на систему гемостаза, посредством устранения инсулинорезистентности (бигуаниды и тиазолидиндионы) [3].

Средства, влияющие на систему инкретинов, способны влиять на гемостаз посредством улучшения функционирования эндотелиоцитов. ГПП-1 снижает экспрессию эндотелиоцитами адгезивных белков (VCAM-1 и ICAM-1) и хемоаттрактантов (MCP-1 и FНО- α), которые отвечают за активацию и накопление иммунных клеток в сосудистой стенке [6, 9], что является одним из ключевых процессов при атеросклерозе и приводит к усилению прокоагуляционных сдвигов в системе гемостаза и воспалению. Также ГПП-1 снижает экспрессию, повышенного при СД типа 2, PAI-1, который замедляет процесс фибринолиза, что непосредственно ухудшает баланс в системе гемостаза [3, 6, 9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании установлено, что гипергликемия, связанная с экспериментальным сахарным диабетом приводит к выраженным нарушениям в системе гемостаза. Введение агониста GPR119 и ингибитора ДПП-4 приводило к нормализации оцениваемых параметров (АЧТВ, ПВ, ТВ и уровень фибриногена). По всей видимости, это связано не только с их сахароснижающим эффектом и способностью улучшать постпрандиальный контроль гликемии, а также с эндотелиопозитивным эффектом и способностью понижать уровень PAI-1. Нормализация ключевых показателей системы гемостаза безусловно является важным качеством, которое необходимо учитывать при выборе или разработке гипогликемического средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дедов И. И. Инновационные технологии в лечении и профилактике сахарного диабета и его осложнений // Сахарный диабет. — 2013. — № 3. — С. 4—10.
2. Кучерявенко А. Ф., Спасов А. А., Науменко Л. В. Влияние нового гипогликемического соединения Лимиглидол на параметры гемостаза при экспериментальном сахарном диабете // Проблемы Эндокринологии. — 2015. — Т. 61, № 1. — С. 51—56.
3. Северина А. С., Шестакова М. В. Нарушение системы гемостаза у больных сахарным диабетом // Сахарный диабет. — 2004. — № 1. — С. 62—67.
4. Спасов А. А., Воронкова М. П., Снизур Г. Л., Чепляева Н. И., Чепурнова М. В. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 // Биомедицина. — 2011. — № 3. — С. 12—18.
5. Спасов А. А., Кучерявенко А. Ф., Салазникова О. А. Влияние гипогликемических средств на гемостаз // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2010. — Т. 73, № 8. — С. 26—28.
6. Сухарева О. Ю., Шмушкович И. А., Шестакова Е. А., Шестакова М. В. Система инкретинов при сахарном диабете 2-го типа: сердечно-сосудистые эффекты // Проблемы эндокринологии. — 2012. — Т. 58. — № 6. — С. 33—42.
7. Тюренков И. Н., Бакулин Д. А., Куркин Д. В., Ломкина Е. М., Волотова Е. В. Агонисты GPR119 рецепторов: характеристика, физиологическая роль и перспективы использования в терапии сахарного диабета 2 и метаболического синдрома // Успехи физиологических наук. — 2015. — Т. 46, № 4. — С. 28—37.
8. Тюренков И. Н., Куркин Д. В., Волотова Е. В., Бакулин Д. А., Ломкина Е. М. Десять новых мишеней для разработки лекарственных средств лечения СД 2 и метаболического синдрома // Сахарный диабет. — 2015. — Т. 18. — № 1. — С. 101—109.
9. Anagnostis P., Athyros V. G., Adamidou F., et al. Glucagon-like peptide-1-based therapies and cardiovascular disease: looking beyond glycaemic control // Diabetes Obes Metab. — 2011. — Vol. 13, № 4. — P. 302—312.
10. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas 2015, 7th edn [Электронный ресурс]. URL: <http://www.idf.org/diabetesatlas> (дата обращения: 18.01.2016)
11. Poucher S. M., Cheetham S., Francis J., et al. Effects of saxagliptin and sitagliptin on glycaemic control and pancreatic β -cell mass in a streptozotocin-induced mouse model of type 2 diabetes // Diabetes Obes Metab. — 2012. — Vol. 14, № 10. — P. 918—926.
12. Reimann F., Gribble F. M. G protein-coupled receptors as new therapeutic targets for type 2 diabetes // Diabetologia. — 2016. — Vol. 59, № 2. — P. 229—233.

Контактная информация

Куркин Денис Владимирович — к. фарм. н., ассистент кафедры фармакологии и биофармации ФУВ, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: strannik986@mail.ru