

ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ АГОНИСТА GPR119 НА МОДЕЛИ РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА

**Д. В. Куркин¹, Д. А. Бакулин¹, Е. В. Волотова¹, М. А. Шафеев²,
И. Н. Тюренков¹, Е. О. Логвинова¹**

¹Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармакологии и биофармации ФУВ,

²ЗАО «Исследовательский институт химического разнообразия», г. Химки, Московская обл.

В работе изучено сахароснижающее действие нового агониста GPR119 рецептора — соединения ZB-16 (0,1 и 1 мг/кг, *per os*) у животных с развивающимся сахарным диабетом. Патологию моделировали трехкратным внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (30 мг/кг/сут.). У животных с развивающимся сахарным диабетом ZB-16 в дозе 1 мг/кг и ситаглиптин значительно уменьшали выраженность гипергликемии и нарушение толерантности к глюкозе при сахарной нагрузке на 14-е и, особенно, на 21-е сутки введения. Терапевтическое действие агониста GPR119 рецептора по влиянию на уровень гликемии и снижению толерантности к глюкозе было сопоставимо с таковым у ингибитора ДПП-4.

Ключевые слова: сахарный диабет, GPR119, инкретины, ситаглиптин, крысы.

HYPOGLYCEMIC ACTIVITY OF A NOVEL GPR119 AGONIST ON A RAT MODEL WITH DEVELOPING DIABETES

**D. V. Kurkin¹, D. A. Bakulin¹, E. V. Volotova¹, M. A. Shafeev²,
I. N. Tyurenkov¹, E. O. Logvinova¹**

¹Volgograd State Medical University,

Department for Pharmacology and Biopharmacy, Volgograd, Russian Federation,

²Chemical Diversity Research Institute, Khimki, Russian Federation.

We investigated hypoglycemic effects of ZB-16 (0,1 and 1 mg/kg, *per os*), a novel GPR119 receptor agonist, in rats with developing diabetes. Diabetes was induced by repeated subdiabetogenic doses (30 mg/kg/day) (*i. p.*) of streptozotocin. In animals with developing diabetes, ZB-16 (1 mg/kg) and sitagliptin significantly reduced the severity of hyperglycemia and improved the impaired glucose tolerance on 14 and 21 days. The therapeutic effects of GPR119 receptor agonist were comparable to those of the DPP-4 inhibitor.

Key words: diabetes mellitus, GPR119, incretins, sitagliptin, rats.

Распространенность сахарного диабета (СД) в мире составляет более 387 млн (около 6,9 % всех взрослых пациентов мира), а к 2035 г. согласно оценкам экспертов международной диабетической федерации (IDF) эта цифра может увеличиться до 592 млн [1]. Риск развития СД типа 2 (СД 2) у лиц с нарушением толерантности к глюкозе по сравнению с общей популяцией повышен в 6,3 раза [10]. Поэтому профилактика СД в группах риска в настоящее время рассматривается как весьма актуальная задача.

В этом отношении необходимо обратить внимание на препараты, обладающие способностью предотвращать/замедлять развитие СД, способные предохранять бета-клетки поджелудочной железы от истощения, апоптоза и последующего снижения общей бета-клеточной массы [2, 8].

С этой позиции привлекает внимание система инкретинов — энтероэндокринных гормонов, стимулирующих глюкозозависимую выработку инсулина (до 50—70 %) и подавляющих выработку глюкагона; регулирующих жизнедеятельность бета-клеток, стимулируя пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественников, повышая экспрессию генов, важных для функционирова-

ния бета-клеток (глюкокиназы, GLUT 2 и др.) и подавляя апоптоз, что, в результате, приводит к качественному и количественному улучшению массы бета-клеток [2, 8].

Таким образом, раннее начало лечения, направленного на улучшение функционального состояния эндокринной части поджелудочной железы, может замедлить прогрессирование заболевания. И подобный подход может стать обязательной частью комплексного лечения СД 2 [2, 8].

При СД показано либо снижение секреции инкретинов (глюкагоноподобный пептид-1, ГПП-1), либо понижение их физиологической эффективности (глюкозозависимый инсулинотропный полипептид, ГИП). Более десятилетия, препараты, подавляющие активность фермента дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4), разрушающего ГПП-1 и ГИП и тем самым продлевающие жизнь, успешно используются для лечения СД 2. Однако на сегодняшний день не зарегистрирован ни один лекарственный препарат, способный стимулировать секрецию инкретинов, что может быть полезным при начальных проявлениях нарушений углеводного обмена [6, 7].

Способностью стимулировать секрецию инкретинов обладают агонисты группы рецепторов, локализу-

щихся в основном на энтероэндокринных клетках кишечника и бета-клетках поджелудочной железы. Данные рецепторы способны активироваться некоторыми компонентами пищи или продуктами ее ферментации: средне- и длинноцепочечными жирными кислотами (C10–C22) — рецептор GPR40 (FFA1), короткоцепочечными жирными кислотами (C3 = C4 = C5 > C2 = C1) для GPR41 (FFA3) и (C2 = C3 > C4 > C5 = C1) для GPR43 (FFA2), производными амидов жирных кислот и фосфолипидами — рецептор GPR119, средне- и длинноцепочечными насыщенными (C14–C18) и ненасыщенными (C16–C22) жирными кислотами — рецептор GPR120 (FFA4) [5, 9]. При активации данных рецепторов специфическими агонистами наблюдается повышение секреции инкретинов и инсулина в присутствии глюкозы, а также некоторые другие эффекты, связанные с регуляцией углеводного обмена [6, 7].

В настоящее время поиск агонистов некоторых из этих рецепторов (GPR40, GPR119 и GPR120) стал перспективным направлением в создании регуляторов углеводного обмена [9]. При этом рецептор GPR119 по результатам множества исследований был признан одним из самых перспективных в этом отношении. Активация GPR119 на энтероэндокринных L- и K-клетках кишечника приводит к повышению синтеза и секреции основных инкретинов (ГИП и ГПП-1) и одновременно с этим активация GPR119 на бета-клетках поджелудочной железы приводит к стимуляции синтеза и секреции инсулина, но только при повышении уровня глюкозы (>4,5—5,0 ммоль/л). Кроме того, у агонистов GPR119 были обнаружены цитопротективные свойства в отношении бета-клеток: способность ингибировать апоптоз и стимулировать пролиферацию бета-клеток [5, 7]. Поэтому можно предполагать, что применение агонистов данного рецептора будет приводить к нормализации постпрандиальной гликемии и улучшению функционального состояния бета-клеток в условиях преддиабета и СД 2.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение гипогликемического действия нового агониста GPR119, а также его влияние на толерантность к глюкозе у животных с развивающимся сахарным диабетом.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Субстанция высокоактивного ($IC_{50} = 7 \text{ нМ}$) агониста GPR119 рецептора — соединения ZB-16 синтезирована Закрытым акционерным обществом «Исследовательский институт химического разнообразия» (ЗАО «ИИХР», г. Химки).

Эксперименты проводились на 50 беспородных половозрелых крысах-самках (6 месяцев, 240—260 г, питомник лабораторных животных ФГУП ПЛЖ «Раполово»).

Гипогликемическое действие соединения изучали на животных с преддиабетом (развивающийся са-

харный диабет), который вызывали внутрибрюшинным трехкратным введением стрептозотоцина (Sigma-Aldrich, США) в дозе 30 мг/кг/сут. [3]. На 4-е сутки измеряли уровень глюкозы натощак и проводили пероральный тест толерантности к глюкозе (ПТТГ). Для эксперимента отбирались животные с уровнем глюкозы натощак в пределах 8—10 ммоль/л, у которых при проведении ПТТГ уровень глюкозы поднимался выше 11 ммоль/л. Тошаковый уровень глюкозы определяли в крови после 6-часового голодания с использованием глюкометра Контур ТС (Bayer, Германия). Исследуемое вещество и препарат сравнения в виде водной суспензии вводили в течение 3 недель внутрижелудочно через зонд. Дозы исследуемого агониста GPR119 была выбрана по результатам предыдущих исследований, доза препарата сравнения выбрана на основании литературных данных [3].

Были сформированы следующие группы животных ($n = 10$):

1. «Интакт» — интактные животные + физиологический раствор;
2. «предСД» — преддиабет + физиологический раствор;
3. «ZB-16 (0,1 мг/кг)» — преддиабет + ZB-16 (0,1 мг/кг/сут.);
4. «ZB-16 (1 мг/кг)» — преддиабет + ZB-16 (1 мг/кг/сут.);
5. «Ситаглиптин» — преддиабет + ситаглиптин (10 мг/кг/сут.).

Пероральный тест на толерантность к глюкозе (ПТТГ) проводили на крысах, после 6- часового голодания, до формирования групп и затем на 14-е и 21-е сутки от начала лечения. При этом глюкозу (per os) вводили через зонд в дозе 3 г/кг, измерение уровня гликемии проводили до, через 30, 60 и 120 мин после введения глюкозы [4].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Prism 5 (GraphPad Software Inc., США) и статистических критериев: Шапиро-Уилка, Краскела-Уоллиса и Ньюмена-Кейлса). Значения $p < 0,05$ расценивались как статистически значимые.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После распределения животных в группах с преддиабетом до начала лечения средние значения гликемии были в пределах от $8,7 \pm 0,6$ до $9,0 \pm 0,5$ ммоль/л (табл. 1). Подобное состояние умеренной гипергликемии, сформировавшееся у животных после введения стрептозотоцина в дозе 30 мг/кг/сут. в течение 3 суток, может говорить о частичном повреждении бета-клеточной массы [3].

Введение исследуемого соединения и препарата сравнения в течение 3 недель способствовало снижению уровня тощаковой гликемии, начиная со второй недели лечения. Более выраженный сахароснижающий

эффект исследуемое соединение ZB-16 оказывало в дозе 1 мг/кг, по сравнению с дозой 0,1 мг/кг, и незначительно уступало ситаглиптину (табл. 2).

На 14-е и 21-е сутки после начала лечения у животных проводили пероральный тест на толерантность к глюкозе. У животных с развивающимся сахарным диабетом без лечения наблюдалось нарушение толерантности к глюкозе: превышение уровня гликемии выше 11,1 ммоль/л при сахарной нагрузке (табл. 2), что соответствует преддиабетному состоянию. Было отмечено, что у животных, получавших ZB-16 в дозе 1 мг/кг и препарат сравнения ситаглиптин, на 14-е сутки эксперимента на фоне снижения уровня тощаковой гликемии сохранялось нарушение толерантности к глюкозе.

При проведении ПТТГ на 21-е сутки, у животных, получавших исследуемое соединение в дозе 1 мг/кг и препарат сравнения ситаглиптин, отмечалось значимое улучшение переносимости глюкозной нагрузки (табл. 2). Так, через 30 мин после введения глюкозы в группах животных, получавших ZB-16 в дозе 1 мг/кг и ситаглиптин средний уровень гликемии был на примерно

треть и половину соответственно меньше, чем в группе животных без лечения (табл. 2). Спустя час после введения глюкозы уровень гликемии во всех группах, получавших лечение продолжал нормализоваться, при сохранении высоких значений в группе «предСД». Через 2 часа после введения глюкозы уровень гликемии всех животных с развивающимся диабетом приблизился к исходным значениям. Однако в абсолютных значениях наименьший уровень глюкозы в плазме наблюдался в группах животных, получавших ZB-16 в дозе 1 мг/кг ($5,7 \pm 0,4$) ммоль/л и ситаглиптин ($5,2 \pm 0,4$) ммоль/л, что заметно ниже значений группы «предСД» без лечения ($9,1 \pm 0,4$) ммоль/л.

Введение исследуемого соединения в дозе 0,1 мг/кг также способствовало снижению толерантности к глюкозе, однако сахароснижающий эффект агониста GPR119 в этой дозе был менее выражен.

При анализе кривых «концентрация глюкозы-время» и подсчета площади под кривой (AUC) наблюдаются очевидные различия между экспериментальными группами (рис.). На 21-е сутки лечения, у животных

Таблица 1

Уровень гликемии у животных с развивающимся СД, получавших лечение в течение 3 недель, ммоль/л

Группа, доза (мг/кг)	До лечения.	Время после начала лечения, дни		
		7	14	21
Интакт	$3,5 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,2$
ПредСД	$8,9 \pm 0,6^*$	$9,3 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,7$	$7,9 \pm 0,3$
ZB-16 (0,1 мг/кг)	$8,7 \pm 0,6^*$	$8,5 \pm 0,5$	$8,0 \pm 0,4$	$5,7 \pm 0,7$
ZB-16 (1 мг/кг)	$9,0 \pm 0,5^*$	$8,9 \pm 0,3$	$6,6 \pm 0,4^{\#}$	$5,1 \pm 0,7^{\#}$
Ситаглиптин (10 мг/кг)	$8,9 \pm 0,3^*$	$8,6 \pm 0,5$	$6,1 \pm 0,4^{\#}$	$4,4 \pm 0,5^{\#}$

Примечание: Интакт — интактная группа животных; ПредСД — группа животных с развивающимся СД без лечения; *различия значимы по отношению к группе интактных животных ($p < 0,05$); #различия значимы по отношению к группе животных без лечения ($p < 0,05$).

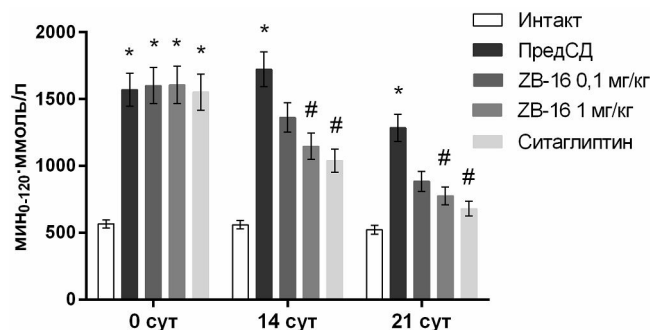
Таблица 2

Уровень гликемии у животных с развивающимся СД при проведении ПТТГ на 14-е и 21-е лечения

Группа	Исход	Время после введения глюкозы <i>per os</i>		
		30 мин	60 мин	120 мин
на 14-е сутки				
Интакт	$4,0 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,2 (+12,5 \%)$	$5,1 \pm 0,3 (+26,7 \%)$	$4,5 \pm 0,1 (+12,3 \%)$
ПредСД	$8,9 \pm 0,7^*$	$17,1 \pm 1,2 (+82,4 \%)^*$	$16,2 \pm 0,8 (+72 \%)^*$	$11,6 \pm 0,6 (+20 \%)^*$
ZB-16 (0,1 мг/кг)	$8,0 \pm 0,4$	$14 \pm 0,7 (+75,1 \%)$	$12 \pm 0,6 (+50,1 \%)$	$9,3 \pm 0,6 (+16 \%)$
ZB-16 (1 мг/кг)	$6,6 \pm 0,4^{\#}$	$11,3 \pm 1,9 (+73 \%)$	$10,7 \pm 1 (+62,6 \%)$	$7,6 \pm 0,5 (+16,6 \%)$
Ситаглиптин	$6,1 \pm 0,4^{\#}$	$10,6 \pm 1,3 (+74,8 \%)^{\#}$	$9,3 \pm 0,9 (+53 \%)$	$7,1 \pm 0,6 (+17,5 \%)$
на 21-е сутки				
Интакт	$3,9 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,21 (+23,1 \%)$	$4,5 \pm 0,4 (+17,4 \%)$	$4,2 \pm 0,3 (+10,3 \%)$
ПредСД	$7,9 \pm 0,3^*$	$13,2 \pm 1 (+77,1 \%)^*$	$11,1 \pm 0,7 (+47,1 \%)^*$	$9,1 \pm 0,4 (+18,5 \%)^*$
ZB-16 (0,1 мг/кг)	$5,7 \pm 0,7$	$9,7 \pm 0,7 (+68,4 \%)$	$6,8 \pm 0,3 (+19,1 \%)$	$6,7 \pm 0,3 (+15,9 \%)$
ZB-16 (1 мг/кг)	$5,1 \pm 0,7^{\#}$	$8,5 \pm 0,3 (+67,4 \%)^{\#}$	$6,1 \pm 0,5 (+19,8 \%)^{\#}$	$5,7 \pm 0,4 (+11,7 \%)$
Ситаглиптин	$4,4 \pm 0,5^{\#}$	$7,1 \pm 0,5 (+60,7 \%)^{\#}$	$5,4 \pm 0,3 (+22,2 \%)^{\#}$	$5,2 \pm 0,4 (+16,1 \%)$

Примечание: Интакт — интактная группа животных; ПредСД — группа животных с развивающимся СД без лечения; % — процент изменения относительно значений до введения глюкозы; *различия значимы по отношению к группе интактных животных ($p < 0,05$); #различия значимы по отношению к группе без лечения ($p < 0,05$).

получавших исследуемое соединение в дозе 1 мг/кг, среднее значение площади под кривой «концентрация глюкозы-время» было на 39,6 % меньше по сравнению с аналогичным показателем группы без лечения.



Примечание: Интакт — интактная группа животных; ПредСД — группа животных с развивающимся СД без лечения; достоверность отличий: *различия значимы по отношению к группе интактных животных ($p < 0,05$); #различия значимы по отношению к группе животных с развивающимся СД без лечения ($p < 0,05$).

Рис. Площадь под кривой «концентрация глюкозы-время» при проведении ПТТГ у животных с развивающимся СД

До наступления клинической формы сахарного диабета 2 типа, в течение нескольких лет пациент проходит ряд последовательных стадий нарушения углеводного обмена: нарушение толерантности к глюкозе, развитие инсулинорезистентности, нарушение липидного обмена и др. На фоне данных процессов происходит постепенная потеря массы бета-клеток и снижение функциональных возможностей поджелудочной железы [2].

Состояние преддиабета обратимо, но диагностировать его в то время как, уровень тощачковой гликемии находится в пределах нормы можно лишь при проведении сахарной нагрузки или измерив гликемию после еды. Однако такие исследования как правило проводят при наличии серьезных, и порой мало обратимых нарушений углеводного обмена. Но и в этом случае, назначение препаратов, улучшающих функцию бета-клеток, может отодвинуть время наступления стадии выраженной декомпенсации островкового аппарата поджелудочной железы [2, 8].

В проведенное исследование были включены животные с тощачковым уровнем глюкозы 8—10 ммоль/л и выше 11 ммоль/л при проведении ПТТГ. Данное состояние соответствует преддиабету и характеризуется некоторыми исследователями как развивающийся СД [3]. При измерении уровня глюкозы натощак видно, что молодые беспородные крысы обладают потенциалом к восстановлению функций островкового аппарата поджелудочной железы после токсического повреждения (табл. 1). Через 21 день после интоксикации у животных без лечения средний уровень гликемии натощак был равен ($7,9 \pm 0,3$) ммоль/л, что, однако не говорит о полном функциональном восстановлении массы бета-клеток,

что и подтверждается ростом гликемии выше 11 ммоль/л при проведении ПТТГ.

В группе животных, получавших соединение ZB-16 (1 мг/кг) и ситаглиптин при проведении ПТТГ на 14й и, особенно на 21й день лечения наблюдалась значительное улучшение усвоения глюкозы при сахарной нагрузке. Это говорит об ускорении восстановления функций островкового аппарата поджелудочной железы при применении агониста GPR119 рецептора и ингибитора ДПП-4. Оба вещества повышают концентрацию эндогенных инкретинов в крови, которые по литературным данным способствуют восстановлению массы бета-клеток [8]. Кроме того, агонист GPR119 рецептора способен оказывать цитопротективное действие, непосредственно взаимодействуя с бета-клетками [5, 7].

Основываясь на результатах проведенного исследования, можно предположить, что в клинической ситуации применение агониста GPR119 рецептора и ингибитора ДПП-4 может улучшить функциональное состояние островкового аппарата поджелудочной железы и замедлить наступление фазы выраженной декомпенсации бета-клеток островкового аппарата поджелудочной железы у пациентов с предСД или нарушением толерантности к глюкозе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании установлено, что применение агониста GPR119 рецептора и ингибитора ДПП-4 у животных с развивающимся сахарным диабетом нормализует уровень гликемии натощак и снижает толерантность к глюкозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дедов И. И., Шестакова М. В., Галстян Г. Р. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / Под редакцией И. И. Дедова, М. В. Шестаковой (7-й выпуск) // Сахарный диабет. — 2015. — Т. 18, № 1S. — С. 1—112.
2. Ленская К. В., Спасов А. А., Чепляева Н. И. Инновационные направления поиска лекарственных препаратов для лечения сахарного диабета типа 2 // Вестник волгоградского государственного медицинского университета. — 2011. — № 4. — С. 10—18.
3. Островская Р. У., Озерова И. В., Гудашева Т. А., Капица И. Г., Иванова Е. А., Воронина Т. А., Середенин С. Б. Сравнительная активность пролинсодержащего дипептида «Ноопепт» и ингибитора дипептидил-пептидазы-4 ситаглиптина на модели развивающегося диабета у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2013. — Т. 156, № 9. — С. 317—322.
4. Спасов А. А., Воронкова М. П., Снигур Г. Л., Чепляева Н. И., Челурнова М. В. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 // Биомедицина. — 2011. — № 3. — С. 12—18.
5. Тюренков И. Н., Бакулин Д. А., Куркин Д. В., Ломкина Е. М., Волотова Е. В. Агонисты GPR119 рецепторов: характеристика, физиологическая роль и перспективы использования в терапии сахарного диабета 2 и метаболического синдрома // Успехи физиологических наук, 2015. — Т. 46, № 4. — С. 28—37.

6. 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.

7. Buzard D. J., Lehmann J., Han S., Jones R.M. GPR119 agonists 2009—2011. Pharm Pat Anal. — 2012. — Vol. 1, № 3. — P. 285—299.

8. Cernea S., Raz I. Therapy in the early stage: incretins. Diabetes Care. — 2011. — Vol. 34, № 2. — P. 264—271.

9. Hirasawa A., Hara T., Katsuma S., et al. Free fatty acid receptors and drug discovery // Biol Pharm Bull. — 2008. — № 31. — P. 1847—1851.

10. Tabak A.G., Herder C., Rathmann W., et al. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development // Lancet. — 2012. — Vol. 379, № 9833. — P. 2279—2290.

Контактная информация

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