

УДК 616-018:616.43:577.1:615.252

Оригинальный дипептидный миметик NGF, селективно активирующий путь PI3K/Akt, повышает выживаемость панкреатических β -клеток на модели диабета

Р. У. Островская*, С. В. Иванов, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин

НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

*E-mail: rita.ostrovskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 04.10.2018

Принята к печати 22.01.2019

РЕФЕРАТ Изучено цитопротективное действие миметика NGF – соединения ГК-2 (гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина)) – на β -клетки поджелудочной железы. Нейропротективное действие ГК-2 и его связь с активацией пути PI3K/Akt были выявлены ранее. На крысах с индуцированным стрептозотоцином диабетом типа 2 (стрептозотоциновая модель диабета (СТЗ)) иммуногистохимическим методом показано, что СТЗ вызывает снижение числа β -клеток и нарушение их морфологической структуры. Введение животным с СТЗ в течение 28 дней ГК-2 в дозе 0.5 мг/кг внутривнутрибрюшинно или 5 мг/кг перорально, а также препарата сравнения метформина в дозе 300 мг/кг перорально уменьшало повреждающее действие СТЗ. Эффекты ГК-2 и метформина на такие функциональные проявления СТЗ, как гипергликемия, потеря массы тела, полифагия, полидипсия, оказались сопоставимыми, а по цитопротективной активности ГК-2 несколько превосходил метформин. Выявлена выраженная корреляция между морфометрическими показателями и уровнем глюкозы в крови. Предполагается, что цитопротективное действие ГК-2 на β -клетки осуществляется через путь PI3K/Akt.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА диабет, ГК-2, метформин, NGF, нейротрофины, путь PI3K/Akt.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СД2 – сахарный диабет типа 2; БА – болезнь Альцгеймера; СТЗ – стрептозотоцин; NGF – фактор роста нервов; TrkA – высокоаффинный рецептор тропомиозин-киназного (Trk) семейства.

ВВЕДЕНИЕ

В поиске новых способов лечения диабета внимание исследователей привлекает сходство нейробиологических механизмов регуляции функций нейронов и β -клеток поджелудочной железы. К признакам этого сходства относятся общие рецепторы, в частности рецепторы ГАМК [1], серотонина [2], глутамата [3], одинаковые ферменты, например, киназа 3 гликогенсинтазы (GSK-3) [4] и факторы транскрипции, в частности NIF [5, 6]. Дополнительным аргументом в пользу сходства нейронов и β -клеток может служить тот факт, что в процессе развития у β -клеток образуются нейроноподобные отростки [7], а нейроны в развивающемся мозге содержат инсулин – гормон β -клеток поджелудочной железы, глюкагон – гормон α -клеток поджелудочной железы и грелин – гормон, выделяемый клетками желудочно-кишечного тракта [8].

На сходство механизмов регуляции функций нейронов и β -клеток указывает участие нейротро-

фических факторов – NGF [7] и BDNF [9] в их росте и дифференцировке. Наряду с нарушением фолдинга белков (β -амилоида в нейронах, амилоидного полипептида в островках поджелудочной железы), развитием окислительного стресса и инсулинорезистентностью [10] общими для болезни Альцгеймера (БА) и сахарного диабета типа 2 (СД2) являются нарушения функции нейротрофинов [11].

Установлено, что β -клетки поджелудочной железы секретируют биологически активный NGF, причем его секреция усиливается под влиянием глюкозы. Даже в условиях кратковременного воздействия NGF резко возрастает стимулируемая глюкозой секреция инсулина. В присутствии моноклональных антител к NGF секреция инсулина снижается [12]. Наряду с этим усиление секреции инсулина блокирует соединение K252a – специфический ингибитор TrkA [13]. Важно подчеркнуть, что рецепторы TrkA выявлены только в β -клетках, но не в α -клетках поджелудочной железы [14].

Используя первичную культуру панкреатических островков человека, Piccus и соавт. [15] не только подтвердили, что в них, как и в β -клетках крысы, экспрессируется NGF, но также показали, что нейтрализация эффекта этого нейротрофина моноклональными антителами к NGF усиливает апоптоз β -клеток. Установлено, что усиление апоптоза β -клеток в условиях дефицита NGF связано со снижением активности PI3K/Akt – одного из основных сигнальных путей TrkA [15].

Попытки создания лекарственных средств, эффективных, в частности, при нейродегенеративных заболеваниях, не прекращаются с момента обнаружения NGF [16]. Однако фармакокинетические ограничения, обусловленные свойствами полноразмерной молекулы NGF, такими, как низкая биологическая устойчивость, неспособность при системном введении проникать через биологические барьеры и наличие побочных эффектов, сделали невозможным использование NGF с целью заместительной терапии. Несколько фирм и лабораторий ведут поиск миметиков нейротрофинов [17], однако сообщений о найденных NGF-миметиках с удовлетворительными фармакокинетическими свойствами до настоящего времени не поступало.

В отделе химии лекарственных средств НИИ фармакологии имени В.В. Закусова сформулирована рабочая гипотеза, согласно которой отдельные структуры нейротрофинов при взаимодействии с одним и тем же рецептором могут активировать разные сигнальные пути, вызывая различные эффекты нейротрофинов [18]. Эта гипотеза легла в основу нового направления фармакологических исследований по созданию эффективных низкомолекулярных миметиков нейротрофинов, свободных от их побочных действий. В рамках предложенной гипотезы на основе структуры Asp⁹³-Glu⁹⁴-Lys⁹⁵-Gln⁹⁶ β -изгиба 4-й петли NGF, который наиболее экспонирован наружу и за счет этого может играть основную роль во взаимодействии NGF с рецептором, сконструирован дипептидный миметик, получивший рабочий шифр «ГК-2» (Патент РФ № 2410392, 2010; Патент US 9,683,014 B2, 2017; Патент CN 102365294 B, 2016) [19]. В соединении сохранен центральный дипептидный фрагмент Glu⁹⁴-Lys⁹⁵, который, согласно стереохимическим принципам, может наиболее глубоко проникать в зону связывания рецептора и наиболее полно распознаваться им. Периферийный Asp⁹³ заменен его биоизоостером, остатком янтарной кислоты, а аминокислотный остаток Gln⁹⁶ замещен амидной группой. Целью указанных замен была стабилизация конформации β -изгиба и увеличение устойчивости соединения к действию пептидаз. NGF представляет собой гомодимер, поэтому с помощью

связывания двух миметиков β -изгиба гексаметилендиаминовым спейсером был получен димерный дипептид гексаметилендиамид бис(моносукцинил-глутамил-лизина).

Известно, что NGF реализует свои основные эффекты, взаимодействуя с рецепторной тирозинкиназой TrkA, при этом проведение сигнала при активации TrkA осуществляется в основном с участием фосфатидилинозит-3-киназного (PI3K/Akt) и митоген-активируемого протеинкиназного (MAPK/Erk) сигнальных путей, с первым из которых связана регуляция выживаемости [20], а со вторым – преимущественно морфологическая дифференцировка.

Нейропротективная активность ГК-2 *in vitro* изучена как на иммортализованных, так и на первичных клеточных культурах. Показано, что ГК-2 в микрономольных концентрациях повышает выживаемость клеток, нарушенную воздействием пероксида водорода, глутаминовой кислоты, 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МФТП) [21]. С использованием вестерн-блот-анализа с антителами к фосфорилированному и нефосфорилированному формам киназ Akt и Erk на клетках линии НТ-22 показано, что активация Akt после внесения ГК-2 происходит в те же самые временные промежутки, что и полноразмерного NGF (через 15, 30, 60 и 180 мин). При этом в аналогичных условиях ГК-2, в отличие от NGF, не вызывал увеличения фосфорилирования киназ Erk. Для уточнения роли различных сигнальных путей в нейропротективной активности ГК-2 изучено влияние селективных ингибиторов фосфатидилинозит-3-киназы и MAPK-киназы, LY294002 и PD98059 соответственно. Инкубация клеток линии НТ-22 с LY294002 (100 мкМ) или PD98059 (50 мкМ) показала, что нейропротективные эффекты как NGF, так и ГК-2 полностью блокируются соединением LY294002, но не PD98059. Эти данные свидетельствуют о том, что реализация нейропротективных эффектов ГК-2 связана с активацией PI3K/Akt-пути при отсутствии влияния на сигнальный путь MAPK/Erk [22].

Убедительные доказательства нейропротективных эффектов ГК-2 получены в опытах *in vivo*. Показана эффективность ГК-2 на различных моделях болезни Альцгеймера (септо-гиппокампальной перерезки, холинергического дефицита, вызванного длительным введением скополамина, и на модели, индуцированной введением стрептозотоцина (СТЗ) в желудочки мозга [23]), а также фокальной и глобальной церебральной ишемии [24] и геморрагического инсульта [25].

Исходя из разрабатываемой нами в течение последних лет концепции целесообразности изучения возможного антидиабетического эффекта веществ

с нейропротекторными свойствами [26, 27], соединение ГК-2 изучено на стрептозотоциновой модели СД2. Показано, что в условиях системного введения ГК-2 устраняет гипергликемический эффект диабетогенного токсина (Патент РФ 2613314, 2017) и ослабляет сопутствующие диабету нарушения поведения у мышей [28].

Данная работа проведена с целью установить, будет ли миметик NGF – ГК-2, проявляющий выраженную нейропротективную активность, защищать также β -клетки. Представлялось целесообразным сравнить ГК-2 по выраженности цитопротективного эффекта с метформинем не только потому, что метформин является антидиабетическим препаратом первого выбора [29], но и потому, что он, как и ГК-2, активирует сигнальный путь PI3K/Akt [30]. В задачи исследования входило также сравнение влияния ГК-2 и метформина на такие проявления СД2, как гипергликемия, потеря веса, полидипсия, полифагия. Представлялось важным установить, в какой степени цитопротективный и антигипергликемический эффекты этих веществ коррелируют между собой.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные

Эксперименты выполнены на взрослых крысах-самцах линии Wistar с исходной массой тела 250–270 г, полученных из питомника «Столбовая». Животные имели свободный доступ к корму (за исключением 16 ч, предшествующих введению СТЗ) и к питьевой воде. Животных содержали в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 от 29 августа 2014 г. № 51. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике НИИ фармакологии имени В.В. Закусова.

Вещества

В качестве диабетогенного токсина применяли СТЗ (Sigma, США). Использовали миметик NGF ГК-2 и метформин (Сиофор, Berlin-Chemie Menarini, Германия), растворенные в физиологическом растворе (ФР).

Дизайн эксперимента

СД2 моделировали путем однократного в/б введения свежеприготовленного раствора СТЗ в дозе 45 мг/кг, растворенного в холодном цитратном буфере (рН 4.5). Выбор этой дозы в качестве моделирующей СД2 связан с выявленным ранее снижением уровня инсулина в крови на 48% и сохранением 30% жизнеспособных β -клеток в поджелудочной железе [27]. Содержание глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены, определяли с помощью прибора One Touch Ultra (США).

Первое определение проводили через 72 ч после введения СТЗ. В дальнейший эксперимент включали только животных, у которых уровень глюкозы в крови составлял не менее 15 ммоль/л. Эксперимент включал две серии. В первой серии крыс ($n = 48$) случайным образом делили на четыре группы: 1) крысам группы пассивного контроля ($n = 12$) в 1-й день эксперимента вводили цитратный буфер однократно в/б, в последующие 28 дней – ФР в объеме 2 мл/кг; 2) крысам группы активного контроля ($n = 12$) в 1-й день эксперимента вводили СТЗ 45 мг/кг, в последующие 28 дней – ФР; 3) крысам первой опытной группы ($n = 12$) однократно вводили СТЗ 45 мг/кг, в последующие 28 дней – ГК-2 в/б в дозе 0.5 мг/кг; 4) крысам второй опытной группы ($n = 12$) после СТЗ вводили ГК-2 перорально в дозе 5 мг/кг в течение 28 дней (десятикратное увеличение дозы при переходе от в/б к пероральному введению используется для большинства дипептидных препаратов) [31, 32]. Во второй серии эксперимента ($n = 36$) крыс делили на три группы: группа пассивного контроля ($n = 12$), группа активного контроля ($n = 12$) (дизайн, аналогичный первой серии) и опытная группа ($n = 12$), которой однократно вводили СТЗ 45 мг/кг, в последующие 28 дней – метформин, перорально в дозе 300 мг/кг, наиболее часто применяемой в эксперименте. Уровень глюкозы во всех группах обеих серий определяли в 1, 7, 14, 21, 28 дни введения препаратов. Потребление корма и воды измеряли ежедневно, взвешивание – каждые 3 дня. Животных умерщвляли декапитацией, после чего проводили иммуногистохимический анализ островкового аппарата поджелудочных желез.

Подготовка препаратов

Извлеченные поджелудочные железы крыс экспериментальных групп фиксировали в 10% нейтральном формалине (рН 7.4) (Sigma, США). Образцы обезжизивали в восходящем ряду спиртов и ксилоле, после чего заливали в парафиновые блоки. Срезы толщиной 5 мкм получали с использованием микротомы (Micritome Jung RM2035, Германия). Микропрепараты (по 4–5 срезов на стекло) сушили на сухой бане при температуре 40°C в течение 60 мин. Перед нанесением антител микропрепараты дважды депарафинировали в ксилоле и гидратировали в нисходящем ряду спиртов, после чего промывали в фосфатном буфере (PBS, Sigma, США) в течение 10 мин. С целью нейтрализации эндогенных пероксидаз микропрепараты в течение 10 мин обрабатывали 3% раствором пероксида водорода.

Иммуногистохимическая реакция

Для предотвращения неспецифического фонового окрашивания за счет связывания первичных антител

с компонентами ткани микропрепараты инкубировали с 10% раствором нормальной козьей сыворотки (Abscam, Великобритания) в течение 1 ч при комнатной температуре. Срезы обрабатывали первичными моноклональными антителами к инсулину (anti-insulin GP 1:500, Abscam, Великобритания) с разведением в фосфатном буфере. Обработанные микропрепараты оставляли на 24 ч во влажной камере при температуре 2–4°C.

Для визуализации результатов иммуногистохимической реакции микропрепараты инкубировали со вторичными моноклональными антителами, меченными пероксидазой (anti-GP Rabbit 1:500, Abscam, Великобритания), в течение 1 ч при комнатной температуре с последующим использованием набора реагентов (DAV Vector Peroxidase, США). Готовые микропрепараты вновь обезвоживали в восходящем ряду спиртов и ксилоле и заключали в среду Eukitt (Panreas, Испания). Достоверность результатов исследования достигалась использованием негативных контролей антигенов и антител.

Микроскопический анализ

Морфометрическое исследование проводили с использованием микроскопа Aristoplan (Leitz, Германия) с цифровой камерой DCM-800 («Микромед», Россия), персонального компьютера и программного обеспечения ScorePhoto при увеличении $\times 620$ (для расчета общей площади микропрепаратов) и $\times 1600$ (для расчета площади островков и β -клеток). Рассчитывали долю β -клеток в общей площади среза, количество панкреатических островков и средний размер островка.

Исходя из опубликованных данных о неоднородности реакции панкреатических островков различного размера на повреждающее воздействие СТЗ [33], был проведен дифференцированный анализ островков по площади с определением процентного содержания доли островков каждого диапазона размеров (менее 500 $\mu\text{м}^2$, 501–2500 $\mu\text{м}^2$, 2501–10000 $\mu\text{м}^2$, более 10001 $\mu\text{м}^2$) от их общего числа.

Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Biostat. Характер распределения данных определяли по критерию Шапиро–Уилка. В связи с нормальным распределением данных статистическую значимость различий между группами оценивали тестом ANOVA. Рассчитывали среднее арифметическое значение M и стандартную ошибку среднего арифметического SEM. Различия средних показателей считали статистически значимым при $p < 0.05$.

Для сравнительной характеристики динамики и выраженности эффекта препаратов рассчитывали

относительный показатель антигипергликемической активности (A_r) по формуле:

$$A_r = [\text{глк (акт. контр.)} - \text{глк (в-во)}] \times 100 \% / [\text{глк (акт. контр.)} - \text{глк (пасс. контр.)}],$$

где глк (акт. контр.) – уровень глюкозы в плазме крови в группе СТЗ и ФР, глк (в-во) – уровень глюкозы в группах СТЗ и ГК-2 или СТЗ и метформин, глк (пасс. контр.) – уровень глюкозы у животных, которым вводили ФР.

С целью сопоставления выраженности цитопроактивной активности ГК-2 и метформина рассчитывали относительный показатель (Цп_a) по формуле:

$$\text{Цп}_a = [\text{Цп (акт. контр.)} - \text{Цп (в-во)}] \times 100 \% / [\text{Цп (акт. контр.)} - \text{Цп (пасс. контр.)}],$$

где Цп (акт. контр.) – % β -клеток в поперечном срезе поджелудочной железы крыс группы СТЗ и ФР, Цп (в-во) – % β -клеток в поперечном срезе поджелудочной железы крыс группы СТЗ и ГК-2 или СТЗ и метформин, Цп (пасс. контр.) – % β -клеток в поперечном срезе поджелудочной железы крыс, которым вводили ФР.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как следует из данных, представленных в *табл. 1*, если в крови животных группы пассивного контроля уровень глюкозы в течение всего периода наблюдения составлял 5–6 ммоль/л, то у крыс с СД на 7-й день эксперимента он возрастал более чем в 3 раза. В дальнейшем (14, 21, 28 дней) уровень сахара у животных активного контроля оставался стабильно высоким – более 20 ммоль/л. О выраженной декомпенсации СД в группе активного контроля свидетельствуют также отрицательная динамика массы тела, полифагия и полидипсия. Выявлена выраженная антидиабетическая активность ГК-2. Уже к концу первой недели его введения отмечено значимое снижение уровня гликемии. Обращает на себя внимание сохранение активности ГК-2 при пероральном введении. Метформин также снижал уровень гликемии (*табл. 2*). Из расчета относительного показателя A_r (*табл. 3*) следует, что его эффект развивался позднее, чем у ГК-2, однако на 3-й и 4-й неделе показатели A_r для метформина были несколько выше, чем у ГК-2.

На благоприятный эффект обоих препаратов указывают и показатели динамики массы тела. В то время как здоровые крысы за период эксперимента прибавили в массе (+16.2% от исходного показателя), под действием СТЗ отмечено ее значительное снижение (-10.3%). Терапия ГК-2 и метформином ослабляла

Таблица 1. Влияние ГК-2 на базальный уровень глюкозы у крыс серии 1

№	Группа	Базальный уровень глюкозы (ммоль/л; M ± m) по дням				
		1	7	14	21	28
1	Пассивный контроль	6.0±0.3	5.9±0.2	6.4±0.2	6.2±0.2	6.4±0.2
2	Активный контроль	21.0±1.5**	30.0±1.2**	23.6±1.9**	23.4±2.1**	24.5±1.9**
3	ГК-2 внутривенно	23.1±1.5	19.1±2.9*	14.3±2.1*	12.5±1.4*	10.8±0.9*
4	ГК-2 перорально	21.9±2.4	25.2±2.4*#	13.5±1.5*	13.2±2.1*	12.2±1.4*

* – Статистическая значимость различий между опытной группой и активным контролем, $p < 0.05$.

** – Статистическая значимость между пассивным контролем и активным контролем, $p < 0.05$.

– Статистическая значимость между опытными группами, $p < 0.05$.

Таблица 2. Влияние метформина на базальный уровень глюкозы у крыс серии 2

№	Группа	Базальный уровень глюкозы (ммоль/л; M ± m) по дням				
		1	7	14	21	28
1	Пассивный контроль	5.4±0.3	5.6±0.2	5.8±0.4	5.8±0.2	5.9±0.3
2	Активный контроль	17.6±0.9**	20.5±1.8**	22.2±1.2**	25.6±2.0**	29.3±1.7**
3	Метформин, 300 мг/кг	18.1±0.7	21.3±2.8	15.6±2.2*	8.8±1.0*	11.0±1.6*

* – Статистическая значимость различий между опытной группой и активным контролем, $p < 0.05$.

** – Статистическая значимость различий между пассивным контролем и активным контролем, $p < 0.05$.

Таблица 3. Относительные показатели антигипергликемической активности (A_r) ГК-2 и метформина

№	Соединение	A_r соединения, % по дням эксперимента				
		1	7	14	21	28
1	ГК-2 в/б	-13.5	45.2	54	63.3	75.4
2	ГК-2 перорально	-6	19.9	59.1	59.2	68.2
3	Метформин	-4.2	-5.7	40.3	84.8	78.2

вызванную СТЗ потерю массы (разница между исходной и конечной величинами – 1.6 и -0.7% при в/б и пероральном введении соответственно и -1.3% для метформина) (отличия от показателей в активном контроле статистически значимы, $p < 0.01$).

Антидиабетическая активность ГК-2 подтверждается снижением полидипсии – важнейшего индикатора СД. В то время как у животных активного контроля отмечена выраженная жажда (суточное потребление воды у нелеченных диабетических крыс на 450% больше, чем у здоровых), диабетические животные, получавшие терапию ГК-2, при в/б введении потребляли воды на 62% меньше, при пероральном введении – на 27%, метформином – на 33% меньше, чем животные группы активного контроля (отличия от показателей активного контроля значимы, $p < 0.01$) (рис. 1).

ГК-2 и метформин влияли и на полифагию. Если животные группы активного контроля к концу эксперимента потребляли на 18.3% больше корма, чем здоровые, то в группе ГК-2 эта разница составляет 2 и 8.5% (в/б и пероральное введение соответственно)

(отличия от показателей активного контроля статистически значимы, $p < 0.01$). Для метформина эта разница менее выражена и составляет 15.0%.

Цитопротективную активность обоих соединений оценивали с помощью иммуногистохимического анализа, высоко специфичного в отношении β -клеток островков Лангерганса. Результаты морфометрического анализа срезов поджелудочной железы приведены в табл. 4, 5.

Полученные данные свидетельствуют об уменьшении числа островков, а также абсолютного и относительного количества β -клеток в группе нелеченных диабетических животных. Для островков крыс этой группы характерно изменение формы и появление дистрофических элементов (рис. 2Б). Введение диабетическим крысам в течение 28 дней ГК-2 и метформина приводит к заметному восстановлению доли β -клеток и их морфологических характеристик (рис. 2В, Г, Д). Вычисление показателя относительной цитопротективной активности свидетельствует о несколько более выраженной цитопротективной активности ГК-2 по сравнению с метформином:

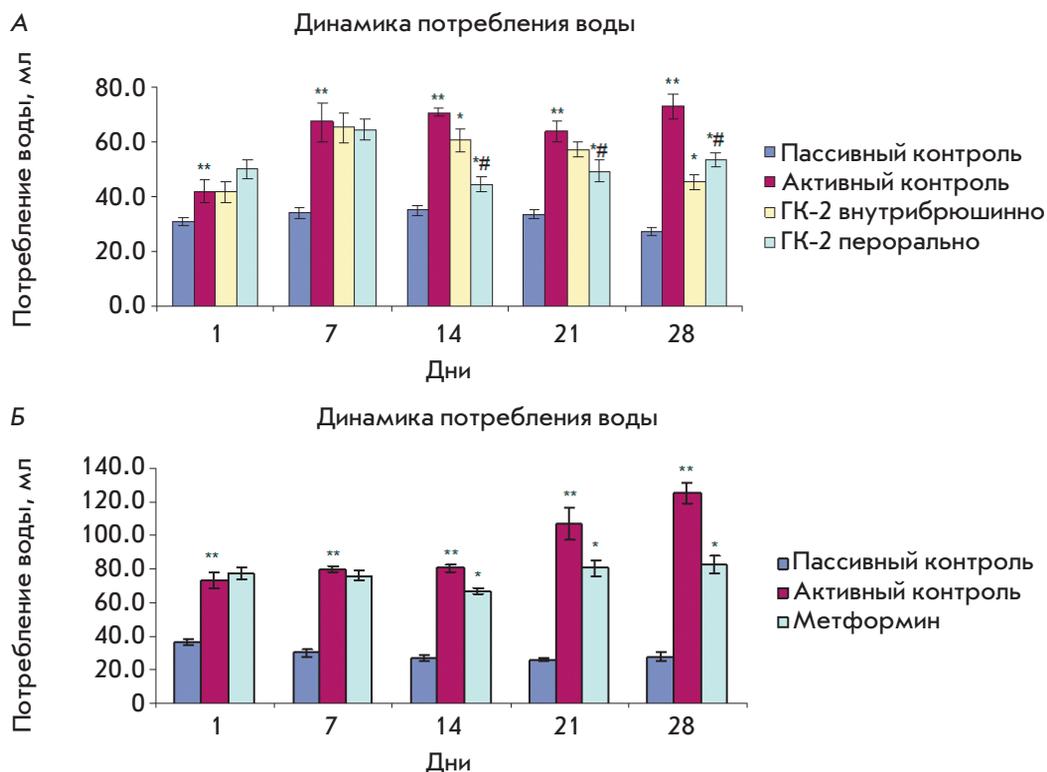


Рис. 1. Динамика потребления воды на 1 крысу. А – ГК-2, Б – метформин. * – Статистическая значимость различий между опытной группой и активным контролем, $p < 0.05$. ** – Статистическая значимость различий между пассивным контролем и активным контролем, $p < 0.05$. # – Статистическая значимость различий между опытными группами, $p < 0.05$

Таблица 4. Влияние ГК-2 на морфометрические показатели островков поджелудочной железы крыс

№	Группа	Суммарная площадь β -клеток		Средняя площадь островка, $\mu\text{м}^2$	Количество островков
		абсолютная, $\mu\text{м}^2$	% от площади островка		
1	Пассивный контроль	259925±46353	19.9±2.3	20088±3920	13±2
2	Активный контроль	79131±21266**	8.3±2.1**	5983±1805**	14±3
3	ГК-2 внутрибрюшинно	180076±36026*	13.3±1.7*	15567±3820*	12±3
4	ГК-2 перорально	175907±31357	14.0±2.0*	15167±1895*	12±2

* – Статистическая значимость различий между опытной группой и активным контролем, $p < 0.05$.

** – Статистическая значимость различий между пассивным и активным контролем, $p < 0.05$.

Таблица 5. Влияние метформина на морфометрические показатели островков поджелудочной железы крыс

№	Группа	Суммарная площадь β -клеток		Средняя площадь островка, $\mu\text{м}^2$	Количество островков
		абсолютная, $\mu\text{м}^2$	% от площади островка		
1	Пассивный контроль	225270±17005	20.0±1.3	18477±2142	12±1
2	Активный контроль	70181±20313**	5.8±2.1**	7646±1654**	9±2
3	Метформин	115353±23845	10.1±0.8*	9749±1714	12±2

* – Статистическая значимость различий между опытной группой и активным контролем, $p < 0.05$.

** – Статистическая значимость различий между пассивным и активным контролем, $p < 0.05$.

$\Pi_{\text{п}}$ для ГК-2 составил 49.5 при в/б введении и 43.4 при пероральном, а для метформина – 30.3.

Представляют интерес результаты дифференциальной оценки площади островков β -клеток (рис. 3).

Если в группе здоровых животных преобладали островки крупных размеров (2501–10000 $\mu\text{м}^2$ и более 10001 $\mu\text{м}^2$), то у нелеченных диабетических животных число крупных островков резко умень-

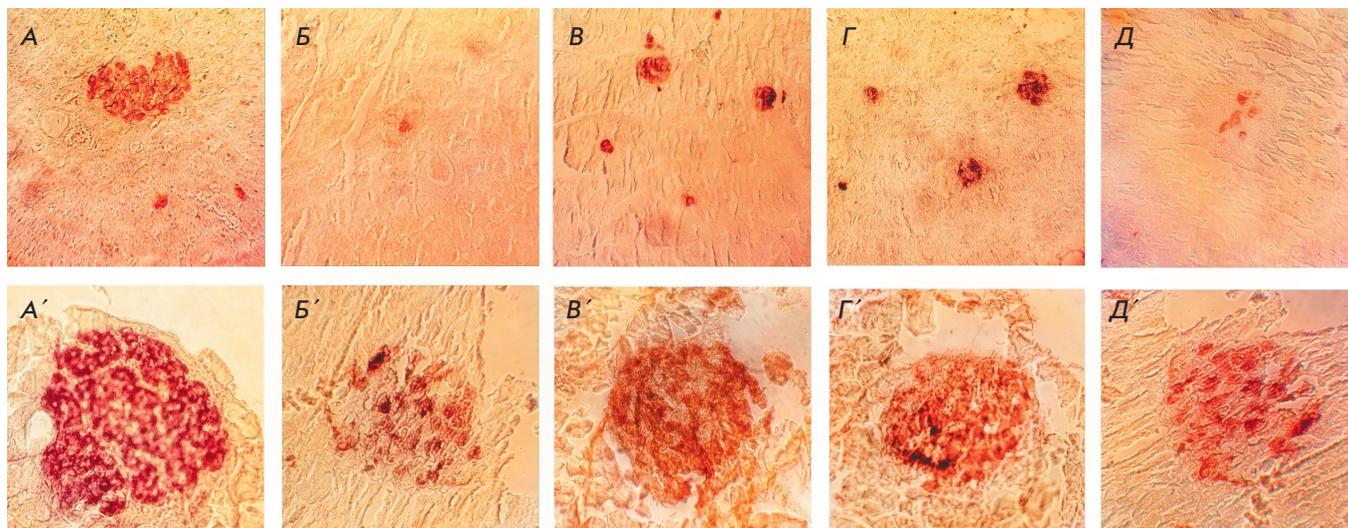


Рис. 2. Панкреатические островки животных разных групп. Увеличение $\times 620$ (верхний ряд) и $\times 1600$ (нижний ряд). А, А' – пассивный контроль; Б, Б' – активный контроль; В, В' – диабетические крысы, получавшие ГК-2 внутривнутрибрюшинно; Г, Г' – диабетические крысы, получавшие ГК-2 перорально; Д, Д' – диабетические крысы, получавшие метформин

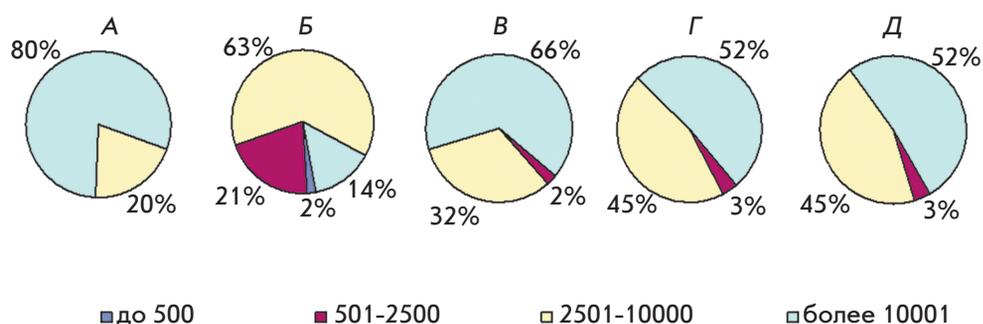


Рис. 3. Доля (%) островков β -клеток различных площадей ($\mu\text{м}^2$). А – пассивный контроль; Б – активный контроль; В – диабетические крысы, получавшие ГК-2 внутривнутрибрюшинно; Г – диабетические крысы, получавшие ГК-2 перорально; Д – диабетические крысы, получавшие метформин перорально

шалось, а мелких увеличивалось (501–2500 $\mu\text{м}^2$ и 2501–10000 $\mu\text{м}^2$). Применение соединения ГК-2 и метформина привело к увеличению доли крупных островков.

Площадь β -клеток (% от общей площади панкреатических островков), характеризующая степень повреждения поджелудочной железы при лечении ГК-2 и метформином, коррелирует с уровнем глюкозы в крови (коэффициент корреляции 0.7256 и 0.6629 соответственно) (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Важной тенденцией современной диабетологии является поиск путей защиты β -клеток от повреждающего действия характерных для СД2 метаболических сдвигов: липоглюкозотоксичность, окислительный стресс, алкилирование ДНК, дефицит АТФ и снижение уровня зрелых нейротрофинов [34, 35]. В своем обзоре «Regulating the beta cell mass as a strategy

for type-2 diabetes treatment» L. Song и соавт. [36] пишут о том, что современная антидиабетическая терапия, направленная в основном на повышение секреции инсулина и его эффективности, а также на поглощение глюкозы, является симптоматической. Подчеркивается, что этиотропная (disease-modifying) терапия должна базироваться на применении веществ, которые предотвращают потерю β -клеток, увеличивая их выживаемость и не оказывая токсических эффектов в отношении других органов.

Определенное место среди них могла бы занять широкая группа соединений-антиоксидантов, которые нейтрализуют свободные радикалы, защищая тем самым β -клетки поджелудочной железы от гибели. Однако ряд исследователей предупреждают о завышенной оценке эффективности антиоксидантов при СД, которые способны лишь поглощать имеющиеся радикалы, но не могут препятствовать образованию новых [37]. Возможно использование соединений

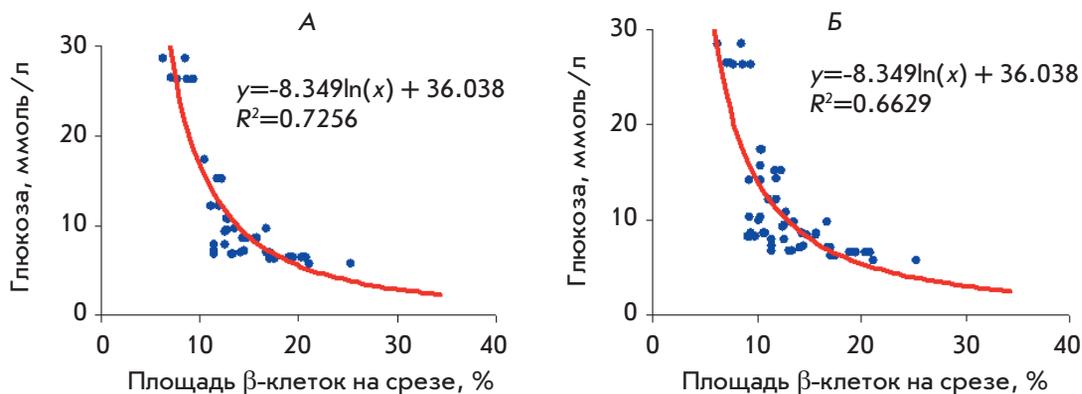


Рис. 4. Корреляция между уровнем глюкозы и относительной площадью β -клеток на срезах поджелудочной железы. А – ГК-2, Б – метформин

других классов, таких, как ингибиторы гистондеацетилазы, блокаторы GSK-3 β . Однако данные молекулы участвуют в регуляции множества процессов, поэтому существует вероятность возникновения нежелательных реакций, в том числе проонкогенного эффекта. Наиболее убедительные доказательства такого эффекта получены для ингибиторов дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4) [38].

Нейротрофины, известные своей способностью повышать выживаемость за счет ослабления апоптоза не только в нейрональных, но и в ненейрональных системах, могли бы оказаться перспективными средствами при СД2, если бы не их неблагоприятные фармакокинетические свойства. Разработанный в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова оригинальный подход к созданию системно-активных низкомолекулярных миметиков NGF и BDNF, лишенных недостатков полноразмерной молекулы, привел к созданию целой серии соединений (Патент РФ № 2410392, 2010; Патент US 9,683,014 B2, 2017; Патент CN 102365294 B, 2016). Одно из них – соединение ГК-2 – миметик четвертой петли NGF, широкий спектр нейропротективных эффектов которого выявлен *in vivo* и *in vitro*.

С помощью высокочувствительного, селективно-иммуногистохимического анализа нами впервые выявлен цитопротективный эффект соединения ГК-2 в отношении β -клеток поджелудочной железы. Если СТЗ в диабетогенной дозе уменьшает число островков Лангерганса, снижает абсолютное и относительное количество β -клеток, изменяет их форму и вызывает появление дистрофических элементов, то введение на фоне развитого диабета (гликемия выше 20 ммоль/л) оригинального димерного дипептидного миметика NGF, соединения ГК-2, приводит к достоверному ослаблению выраженности указанных морфологических изменений. С помощью дифференцированного анализа размеров островков показано, что у здоровых животных преобладают большие островки (площадью 2501–10000 μm^2 и бо-

лее 10001 μm^2), на фоне СТЗ преобладают островки малых размеров (до 500 μm^2), а применение соединения ГК-2 способствует увеличению числа островков больших размеров у диабетических крыс. Этот факт интересно сопоставить с представлениями [33], согласно которым такое увеличение свидетельствует об ослаблении процессов апоптоза. Степень морфологических изменений, оцениваемая по относительной площади β -клеток к общей площади панкреатических островков, четко коррелирует с выраженностью антигипергликемического эффекта ГК-2.

Неоднократно описано, что с помощью глюкозного транспортера GLUT2 СТЗ избирательно накапливается в β -клетках и вызывает их апоптоз [39, 40]. Апоптоз, возникающий под влиянием СТЗ, обусловлен развитием окислительного стресса, а также сдвигом в соотношении предшественника NGF и его зрелой формы в сторону преобладания первого с характерным проапоптотным эффектом [41]. Ранее было показано, что ГК-2, подобно полноразмерной молекуле NGF, увеличивает выживаемость нейрональных клеток, подвергнутых действию пероксида водорода, глутаминовой кислоты, МФТП [21]. Наряду с этим было изучено влияние миметиков нейротрофинов, действующих на разные трансляционные пути, на проявления СТЗ-диабета. Оказалось, что антигипергликемический эффект вызывают только миметики, активирующие путь PI3K/Akt (миметик четвертой петли NGF ГК-2 и миметик первой петли BDNF ГСБ-214), тогда как миметик второй петли BDNF, активирующий путь MAPK/Erk (ГТС-201), лишен антигипергликемической активности [42].

Известно, что нарушение функций β -клеток при СД2 обусловлено снижением активности именно пути PI3K/Akt [43], роль которого как фактора, определяющего сохранение объема и функции β -клеток, показана *in vivo* и *in vitro* [44]. У генетически модифицированных мышей с дефицитом пути PI3K/Akt развивается тяжелый диабет на фоне усиленного апоптоза β -клеток [45, 46]. Дефицит пути PI3K/Akt,

характерный для диабета, воспроизводится на его СТЗ-модели [47].

Важно подчеркнуть, что у трансгенных мышей, сверхэкспрессирующих конститутивно активную форму этого пути, увеличены размер и число панкреатических β -клеток, а также повышена толерантность к глюкозной нагрузке [48].

Совокупность данных о роли дефицита пути PI3K/Akt в развитии апоптоза β -клеток при диабете в сочетании с данными об участии именно этого пути в реализации антигипергликемического эффекта ГК-2 [42] позволяет предположить, что защитное действие ГК-2 также обусловлено способностью этого миметика NGF активировать указанный путь. Тот факт, что ГК-2 оказывает цитопротективное действие не только в отношении нейронов, как показано ранее [49], но и в отношении β -клеток, является важным аргументом в пользу представлений о сходстве механизмов защиты нейронов и β -клеток. Именно в этом состоит фундаментальный аспект нашей работы. Способность этого системно-активного миметика NGF защищать панкреатические β -клетки имеет научно-практическое значение, поскольку это соединение в настоящее время разрабатывается в качестве средства для лечения инсультов, а «существование» инсульта и диабета хорошо установлено [50]. В случае применения ГК-2 при комбинированной сосудистой и диабетической патологии речь может идти о длительном приеме препарата, поэтому важно, что и нейропротективная, и цитопротективная активности ГК-2 в отношении панкреатических β -клеток сохраняются в условиях длительного перорального введения.

Метформин – препарат первой линии при СД2, успешно применяется более 50 лет миллионами людей во всем мире [51]. Известно, что механизм антидиабетического действия метформина является многокомпонентным [52]. Важнейший фрагмент этого механизма – это, несомненно, активация 5'-AMP-активируемой протеинкиназы (АМРК) [53], которая приводит к подавлению экспрессии ключевых ферментов глюконеогенеза в печени. Под действием метформина увеличивается утилизация глюкозы мышцами и усиливается анаэробный гликолиз в тонком кишечнике. Наряду с этим на культуре шванновских клеток показано, что метформин усиливает экспрессию NGF и BDNF [54]. Установлено, что эффект метформина блокируется избирательным ингибитором трансляционного пути PI3K/Akt [30]. Сходство одно-

го из механизмов действия метформина и ГК-2, эффекты которого также зависят от PI3K/Akt, послужило основанием для сравнительного изучения их эффектов на СТЗ-модели СД2. Показано, что по выраженности цитопротективного эффекта в отношении β -клеток ГК-2 не только не уступает метформину, а даже несколько превосходит его. Высокая активность ГК-2, сопоставимая с активностью метформина, определяет научно-практический аспект данного исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе в опытах на крысах не только воспроизведен выявленный ранее на мышах антидиабетический эффект оригинального системно-активного миметика NGF, соединения ГК-2 (гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина)) [28], но и впервые на СТЗ-модели получено прямое доказательство цитопротективного действия ГК-2 в отношении β -клеток поджелудочной железы. Цитопротекция β -клеток является новым актуальным направлением, привлекающим внимание исследователей диабета. Поскольку защитный эффект ГК-2 в отношении нейронов, подвергнутых различного рода повреждающим воздействиям, был описан ранее, полученные в настоящей работе данные о снижении СТЗ-индуцированного апоптоза β -клеток на фоне терапии ГК-2 дополнительно подтверждают правильность концепции сходства нейрохимических механизмов регуляции функций нейронов и β -клеток поджелудочной железы и механизмов их защиты. Важный научно-практический результат этой работы – сопоставимость эффектов ГК-2 и метформина, стандартного антидиабетического препарата первого выбора, по выраженности влияния на функциональные проявления СД2 (гипергликемия, потеря массы тела, полифагия, полидипсия) и цитопротективного действия. ●

Работа выполнена в рамках госзадания на 2019–2021 гг. тема № 0521-2019-0003 «Изыскание фармакологических способов избирательной активации путей трансдукции сигнала тирозинкиназных нейротрофиновых рецепторов как основы для создания лекарственных средств, свободных от побочных эффектов нативных нейротрофинов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baekkeskov S., Aanstoot H., Christgau S., Reetz A., Solimén M., Cascalho M., Folli F., Richter-Olesen H., Camilli P. // Nature. 1990. V. 347. P. 151–157.

2. Noble E.E., Billington C.J., Kotz C.M., Wang C. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2011. V. 300. № 5. P. 1053–1069.
3. Otter S., Lammert E. // Trends Endocrinol. Metab. 2016. V. 27. № 3. P. 177–188.

4. Woodgett J.R. // *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 2003. V. 3 № 4. P. 281–290.
5. Heinis M., Simon M.T., Ilc K., Mazure N.M., Pouysségur J., Scharfmann R., Duvillié B. // *Diabetes.* 2010. V. 59. № 3. P. 662–669.
6. Cheng K., Ho K., Stokes R., Scott C., Scott C., Lau S.M., Hawthorne W.J., O'Connell P.J., Loudovaris T., Kay T.W., et al. // *J. Clin. Invest.* 2010. V. 120. № 6. P. 2171–2183.
7. Polak M., Scharfmann R., Seilheimer B., Eisenbarth G., Dressler D., Verma I.M., Potter H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 5781–5785.
8. Cruz S.A., Tseng Y.C., Kaiya H., Hwang P.P. // *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.* 2010. V. 156. P. 190–200.
9. Bathina S., Das U.N. // *Arch. Med. Sci.* 2015. V. 11. № 6. P. 1164–1178.
10. Ribe E.M., Lovestone S. // *J. Intern. Med.* 2016. V. 280. № 5. P. 430–442.
11. Passaro A., Dalla Nora E., Morieri M.L., Soavi C., Sanz J.M., Zurlo A., Fellin R., Zuliani G. // *J. Gerontol. Biol. Sci. Med. Sci.* 2015. V. 70. № 3. P. 294–302.
12. Rosenbaum T., Vidaltamayo R., Sánchez-Soto M.C., Zentella A., Hiriart M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 23. № 13. P. 7784–7788.
13. Rosenbaum T., Sanchez-Soto M.C., Hiriart M. // *Diabetes.* 2001. V. 50. № 8. P. 1755–1762.
14. Kanaka-Gantenbein C., Tazi A., Czernichow P., Scharfmann R. // *Endocrinology.* 1995. V. 136. № 2. P. 761–769.
15. Pierucci D., Cicconi S., Bonini P., Ferrelli F., Pastore D., Matteucci C., Marselli L., Marchetti P., Ris F., Halban P., et al. // *Diabetologia.* 2001. V. 44. P. 1281–1295.
16. Aloe L., Rocco M.L., Bianchi P., Manni L. // *J. Transl. Med.* 2012. V. 10. P. 239–252.
17. Cirillo G., Colangelo A.M., Bianco M.R., Cavaliere C., Zaccaro L., Sarmientos P., Alberghina L., Papa M. // *Biotechnol. Adv.* 2012. V. 30. № 1. P. 223–232.
18. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // *ДАН.* 2010. Т. 434. № 4. С. 549–552.
19. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. // *Журн. неврол. и психиат.* 2015. Т. 6. С. 63–70.
20. Kaplan D.R., Miller F.D. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000. V. 10. № 3. P. 381–391.
21. Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2011. Т. 150. № 11. С. 607–609.
22. Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Antipova T.A., Firsova Y.N., Konstantinopolsky M.A., Seredenin S.B. // *J. Biomed. Sci.* 2015. V. 8. № 22. P. 106.
23. Поварнина П.Ю., Воронцова О.Н., Гудашева Т.А., Островская Р.У., Середенин С.Б. // *Acta Naturae.* 2013. Т. 5. № 3. С. 88–95.
24. Середенин С.Б., Силачев Д.Н., Гудашева Т.А., Пирогов Ю.А., Исаев Н.К. // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2011. Т. 151. № 5. С. 518–521.
25. Крайнева В.А., Гудашева Т.А., Котельникова С.О., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2012. Т. 154. № 11. С. 598–601.
26. Островская Р.У., Ягубова С.С. // *Психиатрия.* 2014. Т. 61. № 1. С. 35–43.
27. Ostrovskaya R.U., Zolotov N.N., Ozerova I.V., Ivanova E.A., Kapitsa I.G., Taraban K.V., Michunskaya A.M., Voronina T.A., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014. V. 157. № 3. P. 344–349.
28. Ostrovskaya R.U., Yagubova S.S., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. № 33. P. 94–102.
29. Bolen S., Feldman L., Vassy J., Wilson L., Yeh H.C., Marinopoulos S., Wiley C., Selvin E., Wilson R., Bass E.B., et al. // *Ann. Intern. Med.* 2007. V. 147. № 6. P. 386–399.
30. Garabadu D., Krishnamurthy S. // *Pharm. Biol.* 2017. V. 55. № 1. P. 722–728.
31. Жердев В.П., Колыванов Г.П., Литвин А.А., Смирнов В.В., Колик Л.Г., Раскин С.Ю., Ивашкина Н.Ю., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2017. № 1. С. 52–55.
32. Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А., Воронцова О.Н., Бондаренко Н.А., Середенин С.Б. // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2011. Т. 151. № 6. С. 634–637.
33. Feng Z.C., Donnelly L., Li J., Krishnamurthy M., Riopel M., Wang R. // *Lab. Invest.* 2012. V. 92 № 4. P. 543–555.
34. Novelli M., Bonamassa B., Masini M., Funel N., Canistro D., De Tata V., Funel N., Martano M., Soleti A., Campani D., et al. // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2010. V. 382. P. 127–137.
35. Goyal S.N., Reddy N.M., Kalpesh R.P., Kartik T.N., Shreesh O., Chandragouda R.P., Yogeeta O.A., Patel R.C. // *Chem.-Biol. Inter.* 2016. V. 244. P. 49–63.
36. Song I., Muller C., Louw J., Bouwens L. // *Curr. Drug Targets.* 2015. V. 16. № 5. P. 516–524.
37. Johansen J.S., Harris A.K., Rychly D.J., Ergul A. // *Cardiovasc. Diabetology.* 2005. V. 4. № 5. P. 1–11.
38. Tseng C.H., Lee K.Y., Tseng F.H. // *J. Environ. Sci. Health. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 2015. V. 33. № 1. P. 67–124.
39. Schnedl W.J., Ferber S., Johnson J.H., Newgard C.B. // *Diabetes.* 1994. V. 43. P. 1326–1333.
40. Szkudelski T. // *Physiol. Res.* 2001. V. 50. № 6. P. 536–546.
41. Al-Gayyar M.M., Mysona B.A., Matragoon S., Abdelsaid M.A., El-Azab M.F., Shanab A.Y., Ha Y., Smith S.B., Bollinger K.E., El-Remessy A.B. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 1. e54692.
42. Островская Р.У., Ягубова С.С., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2017. Т. 164. № 12. С. 701–705.
43. Lorna M., Rhodes J. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004. V. 287. P. 192–198.
44. Elghazi L., Rachdi L., Weiss A.J., Cras-Meneur C., Bernal-Mizrachi E. // *Diabetes, Obesity Metabolism.* 2007. V. 9. № 2. P. 147–157.
45. Garofalo R.S., Orena S.J., Rafidi K., Torchia A.J., Stock J.L., Hildebrandt A.L., Coskran T., Black S.C., Brees D.J., Wicks J.R., et al. // *J. Clin. Invest.* 2003. V. 112. P. 197–208.
46. Bernal-Mizrachi E., Fatrai S., Johnson J.D., Ohsugi M., Otani K., Han Z., Polonsky K.S., Permutt M.A. // *J. Clin. Invest.* 2004. V. 114. P. 928–936.
47. Cui W., Zhang Y., Lu D., Ren M., Yuan G. // *Mol. Med. Rep.* 2016. V. 13. P. 543–549.
48. Bernal-Mizrachi E., Wen W., Stahlhut S., Welling C.M., Permutt M.A. // *J. Clin. Invest.* 2001. V. 108. P. 1631–1638.
49. Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Seredenin S.B. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. V. 162. № 4. P. 454–457.
50. Al-Rubeaan K., Al-Hussain F., Youssef A.M., Subhani S.N., Al-Sharqawi A.H., Ibrahim H.M. // *J. Diabetes Res.* 2016. V. 4132589. P. 1–9.
51. Clodi M., Abrahamian H., Drexel H., Fasching P., Hoppichler F., Kautzky-Willer A., Lechleitner M., Ludvik B., Prager R., Roden M., et al. // *Wien Klin. Wochenschr.* 2012. V. 124. № 2. P. 10–16.
52. Rena G., Pearson E.R., Sakamoto K. // *Diabetologia.* 2013. V. 56. P. 1898–1906.
53. Zhou G., Myers R., Li Y., Chen Y., Shen X., Fenyk-Melody J., Wu M., Ventre J., Doebber T., Fujii N., et al. // *J. Clin. Invest.* 2011. V. 108. P. 1167–1174.
54. Ma J., Liu J., Yu H., Chen Y., Wang Q., Xiang L. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015. V. 8. № 6. P. 6748–6755.