УДК 615.214.31:616.831-005.4

ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ РАЗНЫХ ДОЗ АГОНИСТА GPR119 – СОЕДИНЕНИЯ ZB-16 ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Бакулин Д.А.[1], Куркин Д.В.[1], Волотова Е.В.[1], Шафеев М.А.[2], Тюренков И.Н.[1]

[1]ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Волгоград, e-mail: mbfdoc@gmail.com;
[2]ЗАО «Исследовательский институт химического разнообразия», Химки

В работе изучено влияние лечебно-профилактического введения агониста рецептора GPR119 на течение и исход экспериментального нарушения мозгового кровообращения у крыс-самцов линии Wistar. Исследуемое соединение агонист GPR119 – соединение ZB-16 (дипиарон) вводили в дозах 0,1, 1, 10 и 25 мг/кг (peros). После моделирования ишемии головного мозга оценивали летальность животных, а у выживших тяжесть неврологических нарушений. В качестве препарата сравнения использовался цитиколин (500 мг/кг). В группе, получавшей соединение ZB-16 в дозе 1 мг/кг, наблюдалась тенденция к снижению выраженности психоневрологического дефицита. В опытных группах, получавших соединение ZB-16 в дозах 10 и 25мг/кг, наблюдалось меньшее число летальных исходов по сравнению с контрольной группой. Выраженность неврологического дефицита и нарушения координации были менее выражены, в то время как двигательная и ориентировочно-исследовательская активность в «Открытом поле» была выше. Церебропротекторное действие соединения ZB-16 в дозах 10 и 25 мг/кг было сопоставимо с таковым у цитиколина.

Ключевые слова: GPR119, инкретины, ишемия головного мозга, цитиколин.

CEREBROPROTECTIVE ACTIVITY OF DIFFERENT DOSES OF GPR119 AGONISTS IN EXPERIMENTAL CEREBRAL ISCHEMIA

Bakulin D.A.[1], Kurkin D.V.[1], Volotova E.V.[1], Chafeev M.A.[2], Tyurenkov I.N.[1]

[1]Volgograd State Medical University, Department for Pharmacology and Biopharmacy, Volgograd, e-mail: mbfdoc@gmail.com;
[2]Chemical Diversity Research Institute, Khimki

This study investigated the effect of the administration of novel GPR119 receptor agonist (ZB-16), on the outcome of experimental cerebral ischemia in Wistar rats. ZB-16 was administered at doses of 0.1, 1, 10 and 25 mg/kg (per os). After modeling of brain ischemia was assessed mortality and severity of neurological disorders. As reference agent was used citicoline (500 mg/kg).In the group receiving Compound ZB-16 at a dose of 1 mg/kg showed a tendency to reduce the severity of neurological disorders. In the experimental groups treated with doses of 10 and 25 mg/kg, there were fewer deaths rate as compared to controls. Severity of neurological deficits and impaired coordination have been less pronounced, while the motor and the orienting-investigative activity in the "open field" test was higher. Cerebroprotective action of the compounds ZB-16 at doses of 10 and 25 mg/kg was comparable with that of citicoline.

Keywords: GPR119, incretins, cerebral ischemia, citicoline.

В настоящее время сахарный диабет (СД) является одним из самых распространённых эндокринных заболеваний; так к концу 2015 года численность больных СД по данным Международной диабетической федерации составила 415 млн человек и число пациентов продолжает стремительно расти. Причиной этому служит возрастание влияния на человека негативных факторов внешней среды – неправильное питание, малоподвижный образ жизни, стресс, плохая экология и множество других факторов [4].

Исследования последних лет показали, что применение устойчивых аналогов глюкагон подобного пептида 1 (ГПП-1) – эксенатида и лираглутида для лечения СД 2 типа, помимо выраженного гипогликемического действия, значимо снижает риск развития сердечно-сосудистых осложнений сахарного диабета. В большом количестве экспериментальных работ было отмечено их эндотелио-, кардио- и нейропротекторное действие [1,2,7,11].

Рецептор GPR119, расположенный на энтероэндокринных клетках, вырабатывающих ГПП-1 и ГИП, рассматривается в качестве перспективной фармакологической мишени для новой группы соединений с гипогликемической активностью, повышающих секрецию эндогенных инкретинов [5,10]. Однако пока нет опубликованных данных, показывающих церебропротекторный потенциал соединений, повышающих секрецию эндогенных инкретинов, при ишемическом поражении головного мозга.

Цель исследования: оценить влияние лечебно-профилактического введения нового агониста GPR119 рецептора, соединения ZB-16 на течение ишемии головного мозга при необратимой окклюзии общих сонных артерий.

Материалы и методы

Исследование проводилось на 85 интактных крысах-самцах массой 280–300 г, в возрасте 6–7 месяцев (питомник лабораторных животных ФГУП ПЛЖ «Рапполово», Санкт-Петербург). Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. Все манипуляции с животными проводились с учетом правил лабораторной практики, изложенных в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств», ч. I (М.,2012) под ред. А.Н. Миронова.

Исследование церебропротективной активности агониста рецептора GPR119 выполнено на модели ишемии головного мозга, воспроизводимой одномоментной необратимой перевязкой общих сонных артерий [9]. В качестве наркоза использовали хлоралгидрат (400 мг/кг, внутрибрюшинно).

Исследуемое соединение под лабораторным шифром ZB-16 (дипиарон) (рисунок 1) было синтезировано в ЗАО ИИХР г. Химки РФ и представляет собой высокоселективный агонист рецептора GPR119 (EC_{50} M – 7.25E^{-09}). По результатам предыдущих исследований, соединение ZB-16 оказывает сопоставимое с препаратом из группы ингибиторов ДПП-4 (ситаглиптин) гипогликемическое действие у животных с экспериментальным сахарным диабетом [5,10].

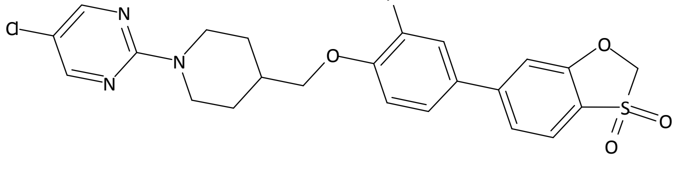

Рис. 1. Химическая структура агониста GPR119 рецептора – соединения ZB-16

Агонист рецептора GPR119 вводился в 4-х дозах (0,1, 1, 10, 25 мг/кг), с учетом фармакокинетических параметров соединения (Tmax=4ч, $t_{1/2}$=13ч): за 4 часа до операции, затем через 12, 24, 48 и 72 часа после операции, в виде водной суспензии перорально. В качестве препарата сравнения использовали цитиколин в дозе 500 мг/кг (peros) [6].

Летальность, неврологический дефицит (баллы по шкале McGrow) и нарушение координации движений (в тесте «Ротарод») регистрировали через 24, 48 и 72 часа после операции. Двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность оценивали через 72 часа в тесте «Открытое поле» [8].

Были сформированы 7 групп животных:«ЛО+физ.р-р» – ложнооперрированная (ЛО) – у животных этой группы выполнялись все манипуляции по выделению сонных артерий и подведению под них лигатур, но окклюзию не воспроизводили (n=10); «ООСА+физ.р-р» – животным воспроизводили двустороннюю окклюзию общих сонных артерий (ООСА) и вводили физиологический раствор (n=15); 3-я, 4-я, 5-я и 6-я группа животных с ООСА получали соединение ZB-16 соответственно в дозах 0,1, 1, 10 и 25 мг/кг (n=12); 7-я группа животных с ООСА получала препарат сравнения цитиколин (500 мг/кг) (n=12).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакетов программ: Microsoft Office Excel 2013, (Microsoft, США) и Statistica 6,0 (StatSoft, Inc., США), а также критериев Краскела – Уолиса, Дана и критерия хи-квадрат. Статистически значимой считалась разница при $p<0{,}05$.

Результаты

Перевязка сонных артерий вызвала гибель большинства животных контрольной группы (60 %), которые получали физиологический раствор, а также соединение ZB-16 в дозе 0,1 мг/кг (58 %) в качестве лечения (таблица). Введение соединения ZB-16 в дозе 1 мг/кг также не приводило к значительному снижению количества погибших, однако в группах, получавших его в дозах 10 и 25 мг/кг, наблюдалась сходная тенденция к снижению количества погибших животных по сравнению с контрольной группой ($p<0{,}1$) (по 4 погибших животных из 12 (33 %)), что было сопоставимо с таковым в группе, получавшей цитиколин (25 %) ($p<0.05$).

Летальность животных после перевязки общих сонных артерий

Группа	Количество погибших животных после ООСА					n	%
	6 часов	12 часов (сумма)	24 часа (сумма)	48 часа (сумма)	72 часа (сумма)		
ЛО+физ.р-р	-	-	-	-	-	10	0
ООСА+физ.р-р	2	1 (3)	3 (6)	2 (8)	1 (9)	15	60
ООСА+ZB-16(0,1 мг/кг)	2	1 (3)	2 (5)	1 (6)	1 (7)	12	58
ООСА+ZB-16 (1 мг/кг)	1	3 (4)	- (4)	1 (5)	1 (6)	12	50
ООСА+ZB-16 (10 мг/кг)	1	- (1)	1**(2#)**	2 (4)	- **(4#)**	12	33

ООСА+ZB-16 (25 мг/кг)	1	1 (2)	1 (3)	- **(3#)**	1**(4#)**	12	33
ООСА+Цитиколин	-	2 (2)	- **(2#)**	-**(2*)**	1**(3*)**	12	25

Примечание: * – различия достоверны относительно группы «ООСА+физ.р-р» при р<0,05, # – тенденция к снижению количества погибших животных по сравнению с группой «ООСА+физ.р-р» (р<0,1) (критерий хи-квадрат).

У выживших животных после моделирования ишемии головного мозга возникали симптомы неврологического дефицита в виде парезов и параличей конечностей, одно- и двусторонних блефароптозов, мышечного тремора, манежности движений, судорог и ком. Наиболее выраженными они были у животных контрольной группы, получавших физиологический раствор. Так, через 24 часа после перевязки неврологический дефицит по балльной шкале McGrowy этих животных достиг 4,87±1,13 балла, к 48 и 72 часам уже 6,47±1,07 и 6,80±1,06 балла соответственно. У животных, которым вводилось исследуемое соединение в дозе 10 и 25 мг/кг, выраженность симптомов неврологического дефицита была значимо меньше и через 72 часа соответственно составляла 3,88±1,32 и 3,83±1,33 балла (рисунок 2). Таким образом, введение исследуемого агониста GPR119 в дозе 10 и 25 мг/кг значимо снижает тяжесть неврологических симптомов у животных после перевязки сонных артерий, незначительно уступая по эффективности цитиколину.

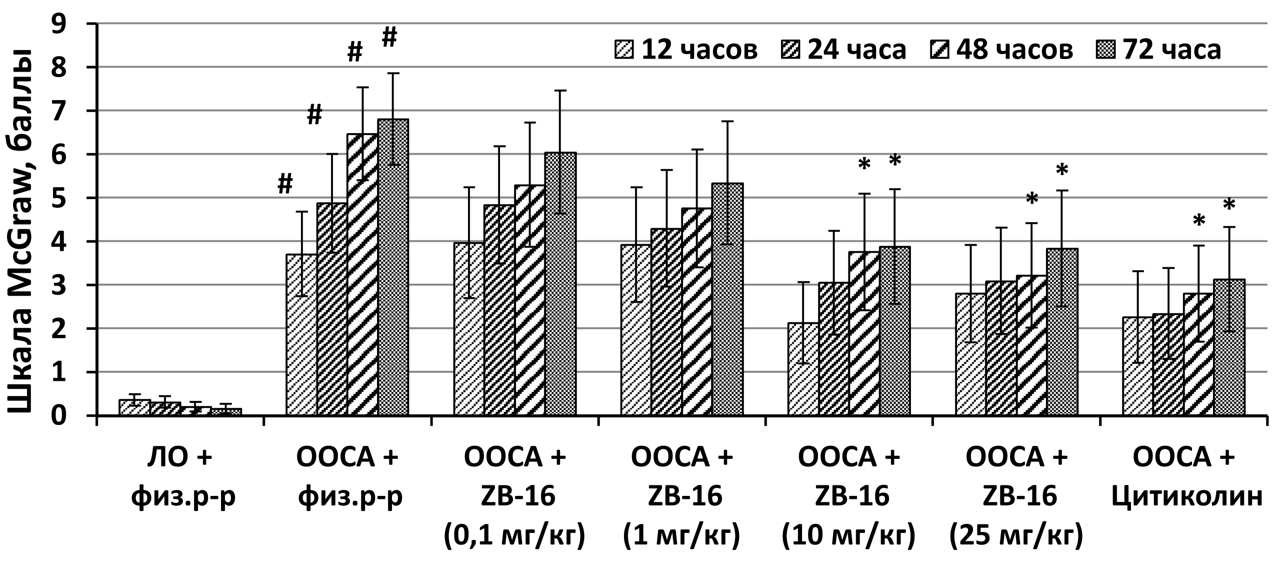

Рис. 2. Неврологический дефицит животных в баллах (McGrow)

Обозначения: # – различия достоверны относительно группы «ЛО+физ.р-р»; * – различия достоверны относительно группы «ООСА+физ.р-р» (р<0,05, критерий Дана).

На фоне введения исследуемого соединения в дозах 1, 10 и 25 мг/кг, ориентировочно-исследовательская активность выживших животных через 72 часа после перевязки общих сонных артерий была дозозависимо выше по сравнению с контрольной группой (рисунок 3).

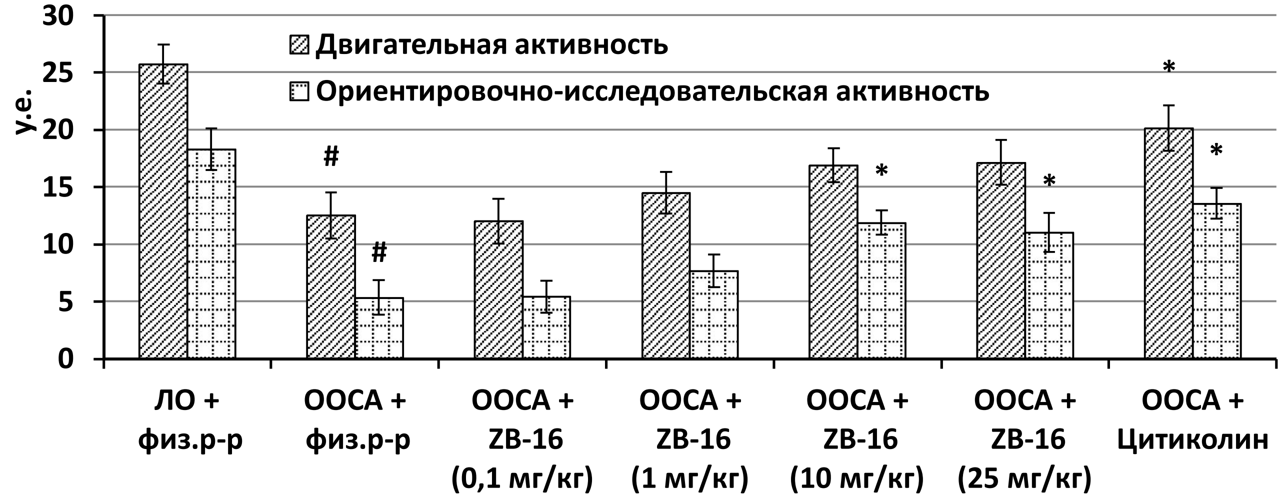

Рис. 3. Двигательная и ориентировочно-исследовательская активность животных после перевязки сонных артерий

Обозначения: # – различия достоверны относительно группы «ЛО+физ.р-р»; * – различия достоверны относительно группы «ООСА+физ.р-р» ($p<0,05$, критерий Дана).

Для оценки сенсомоторной координации, силы и выносливости в экспериментальной практике широко используется тест Ротарод, в том числе и для определения неврологических нарушений после моделирования различных патологий мозгового кровообращения. В нашем исследовании тест Ротарод проводили через 24, 48 и 72 часа после перевязки общих сонных артерий, фиксировали латентный период первого падения после «посадки» животного на вращающийся барабан (время наблюдения 3 минуты). В контрольной группе наблюдалось значительное снижение обоих показателей (в 6–7 раз по сравнению с группой ЛО), при этом во всех опытных группах (кроме группы, получавшей ZB-16 в дозе 0,1 мг/кг) наблюдалось увеличение времени удержания с первых к третьим суткам тестирования. У животных, получавших соединение ZB-16 в разных дозах, начиная с 1 мг/кг, и особенно при использовании 10 и 25 мг/кг, наблюдалась выраженная позитивная динамика восстановления мышечной силы и координации движений. Животные, получавшие соединение ZB-16 в дозах 10 и 25 мг/кг, значимо превосходили показатели контрольной группы животных и лишь незначительно уступали тем, которые получали цитиколин (рисунок 4А и Б).

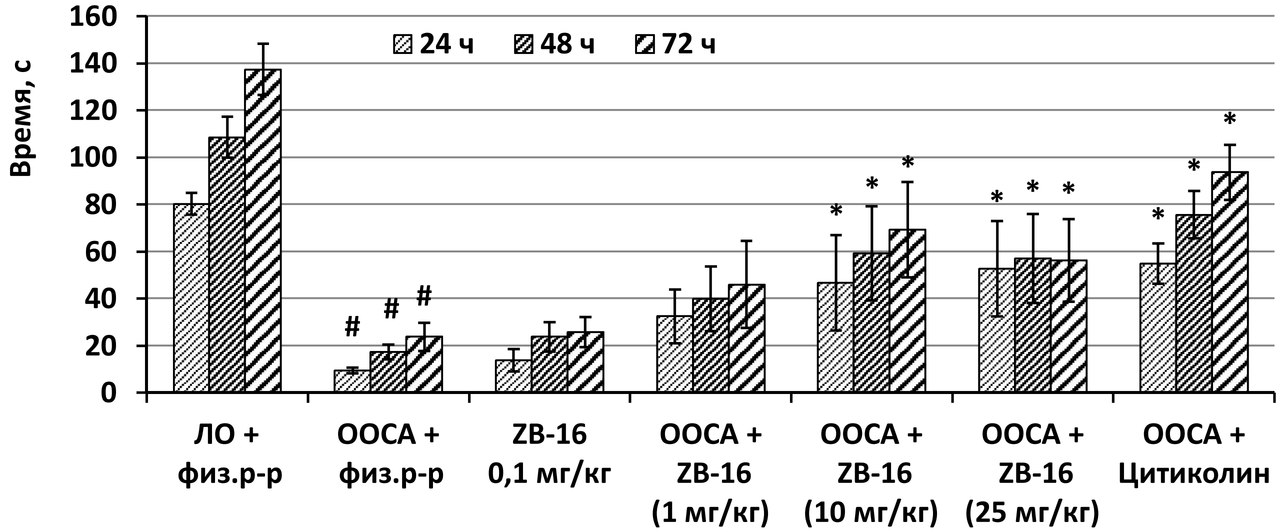

Рис. 4. Время удержания на вращающемся стержне в тесте «Ротарод» за 1 попытку

Обозначения: # – различия достоверны относительно группы «ЛО+физ.р-р»; * – различия достоверны относительно группы «ООСА+физ.р-р» ($p<0,05$, критерий Дана).

Обсуждение

Противодиабетические препараты на основе агонистов GPR119 предполагаются для применения пациентами с СД2 типа, которые, как известно, имеют повышенный риск развития ишемического инсульта [3]. Соединение ZB-16 является селективным агонистом GPR119 рецептора и в наших предыдущих исследованиях проявляло выраженную гипогликемическую активность и нормализовало параметры коагуляционного гемостаза у животных с экспериментальным СД 2 типа, что очевидно связано с повышением уровня инкретинов при активации данного рецептора на энтероэндокринных клетках [5,10]. Учитывая нейро- и эндотелиопротекторные свойства средств с инкретиновой активностью [2,11], мы предположили, что исследуемый агонист рецептора GPR119 может снижать тяжесть течения ишемического поражения головного мозга при перевязке общих сонных артерий у интактных животных.

В проведенном исследовании, в группах животных, получавших соединение ZB-16 в дозах 10 и 25 мг/кг перед моделированием ишемии головного мозга и ежедневно в течение 3-х дней после нее, отмечалась меньшая смертность, более низкий неврологический дефицит и более высокая исследовательская активность, мышечная сила и координация движений по сравнению с группой без лечения. Ранее нами было показано, что увеличение дозы соединения ZB-16 с 0,1 мг/кг до 1 мг/кг приводило к увеличению его гипогликемического действия на животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД, но дальнейшее увеличение до 10 мг/кг такого эффекта не оказывало. В то же время исследуемый агонист относится к малотоксичным веществам (острая токсичность при пероральном применении составляла выше 2500 мг/кг для крыс, неопубликованные данные), что позволяет оценить его плейотропные эффекты на более высоких дозах. Мы предположили, что гипогликемическое действие соединения ZB-16 ограничено возможностью поджелудочной железы, поскольку является инкретинопосредованным и, следовательно, инсулинозависимым, однако это утверждение может не распространяться на его плейотропные эффекты. Поэтому при анализе церебропротекторного действия мы увеличили дозу соединения ZB-16 до 10 и 25 мг/кг. Оказываемое исследуемым соединением церебропротекторное действие при его превентивно-терапевтическом применении в дозах 10 и 25 мг/кг было сопоставимо с таковым у препарата сравнения – цитиколина.

Полученные результаты позволяют говорить о способности агониста GPR119 рецептора – сединения ZB-16 оказывать положительное влияние на течение и исход ишемического поражения головного мозга при превентивно-терапевтическом применении.

Выводы

Лечебно-профилактическое введение агониста GPR119 рецептора – соединения ZB-16 в дозах 10 и 25 мг/кг значимо повышало выживаемость животных после одномоментной необратимой перевязки общих сонных артерий, уменьшало выраженность неврологических нарушений по шкале McGraw, координацию движений в тесте Ротарод, а также двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность в тесте Открытое поле.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минпромторга РФ, в рамках реализации государственного контракта «Доклинические исследования лекарственного средства для лечения сахарного диабета 2 типа на основе агонистов GPR119 рецептора» № 13411.1008799.154 от 24 июля 2013 года.

Список литературы

1. Аметов А.С., Камынина Л.Л., Ахмедова З.Г. Кардиопротективные эффекты агонистов рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 // Кардиология. – 2014. – Т.54. – № 7. – С.92-96.
2. Власов Т.Д., Симаненкова А.В., Дора С.В. и др. Механизмы нейропротективного действия инкретиномиметиков // Сахарный диабет. – 2016. – Т.19, № 1. – С. 16-23.
3. Гудкова В.В., Стаховская Л.В., Мешкова К.С. и др. Инсульт у больных сахарным диабетом как мультидисциплинарная проблема // Consilium Medicum. – 2015. – Т.17, № 9. – С.27-31.
4. Дедов И.И., Шестакова М.В., Галстян Г.Р. и др. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / под редакцией И.И. Дедова, М.В. Шестаковой (7-й выпуск) // Сахарный диабет. – 2015. – Т.18, №. 1 (приложение 1). – С.1-112.

5. Куркин Д.В., Волотова Е.В., Бакулин Д.А. и др. Влияние нового агониста рецептора GPR119 соединения ZB-16 на коагуляционный гемостаз крыс при экспериментальном сахарном диабете // Вестник ВолгГМУ. – 2016. – № 1(57). – С.48-51.
6. Парфенов В.А. Цитиколин в лечении инсульта и сосудистых когнитивных нарушений // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2009. – № 3-4. – С. 69-74.
7. Сухарева О.Ю., Шмушкович И.А., Шестакова Е.А. Система инкретинов при сахарном диабете 2-го типа: сердечно-сосудистые эффекты // Проблемы эндокринологии. – 2012. – № 6. – С. 33-42.
8. Тюренков И.Н., Бородкина Л.Е., Воронков А.В. и др. Влияние новых производных фенибута на мнестическую функцию и ориентировочно-исследовательское поведение животных в условиях хронической алкоголизации // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2003. – Т. 59, № 9. – С. 46-49.
9. Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Волотова Е.В. и др. Влияние различных композиций фенибута с органическими кислотами на неврологический, когнитивный и поведенческий дефицит у крыс при фокальной ишемии головного мозга // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – Т. 115, № 8. – С. 61-63.
10. Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Бакулин Д.А. и др. Сравнение гипогликемической активности нового агониста GPR119 и ингибитора ДПП-4 ситаглиптина // Проблемы эндокринологии. – 2016. – Т. 62, № 1. – С. 38-43.
11. Oyama J., Higashi Y., Node K. Do incretins improve endothelial function? // Cardiovasc Diabetol. – 2014. – Vol.13. – P.21.