

ЭНДОТЕЛИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА НОВОГО АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА GPR119 (ДИПИАРОН) У ЖИВОТНЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ НАРУШЕНИЕМ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Куркин Д.В.¹, Логвинова Е.О.¹, Бакулин Д.А.¹, Волотова Е.В.¹, Тюренков И.Н.¹

¹*Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, e-mail: strannik986@mail.ru*

Сосудистые осложнения сахарного диабета во многом обусловлены дисфункцией эндотелия. Немногие лекарственные средства, применяемые для лечения сахарного диабета в настоящее время, обладают эндотелиопозитивным действием, только гипогликемические препараты с инкретиномиметическим механизмом действия проявляют эндотелиотропный эффект. Агонисты рецептора GPR119 увеличивают секрецию инкретинов, нарушенную при сахарном диабете 2 типа, и потенциально могут восстанавливать эндотелиальную функцию, которая нарушается при хронической гипергликемии. Целью данного исследования явилось изучение влияния агониста рецептора GPR119, соединения ZB-16 (Дипиарона), метформина и их комбинации на вазодилатирующую функцию эндотелия у животных с СД и ХНМК. Через 30 дней после моделирования СД у крыс измеряли скорость мозгового кровотока в проекции СМА после внутривенного введения модификаторов синтеза оксида азота – ацетилхолина и нитро-L-аргинина. По проценту прироста/снижения скорости мозгового кровотока относительно исходного уровня судили о мощности NO-синтазной системы эндотелия. Было обнаружено, что соединение ZB-16 в монотерапии, и в особенности в комбинации с метформином, существенно корректировало нарушенную вазодилатирующую функцию эндотелия: скорость кровотока в проекции среднемозговой артерии повышалась при введении ацетилхолина на 23% и 31% и снижалась при введении нитро-L-аргинина на 25% и 40% у животных, получавших соединение ZB-16 и его комбинацию с метформином соответственно. В то же время в контрольной группе введение ацетилхолина вызывало минимальное увеличение скорости церебрального кровотока (+15%), а введение нитро-L-аргинина – минимальное снижение (-18%).

Ключевые слова: сахарный диабет, нарушение мозгового кровообращения, эндотелиальная дисфункция, агонист рецептора GPR119.

ENDOTHELIOPROTECTORAL PROPERTIES OF THE NEW AGONIST OF GPR119 (DIPIARON) IN ANIMALS WITH CHRONIC CEREBROVASCULAR DISEASE AND EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

Kurkin D.V.¹, Logvinova E.O.¹, Bakulin D.A.¹, Volotova E.V.¹, Tyurenkov I.N.¹

¹*Volgograd State Medical University, Volgograd, e-mail: strannik986@mail.ru*

Vascular complications of T2DM are largely due to endothelial dysfunction. Only few drugs used to treat T2DM have endotheliopositiv activity and only hypoglycemic drugs with incriminations mechanism of action show endotheliotropic effect. The GPR119 agonists increase the secretion of hormones disturbed in T2DM, and potentially can restore endothelial function, which is impaired in chronic hyperglycemia. The aim of this study was to investigate the influence of the GPR119 agonist, compound ZB-16 (Dipiaron), Metformin and their combination on vasodilatation endothelial function in animals with diabetes and chronic cerebrovascular disease. After 30 days of modulating T2DM, rats were measured the level of cerebral blood flow in the projection of middle cerebral artery after intravenous administration of modifiers of the synthesis of nitric oxide – acetylcholine and nitro-L-arginine. By the percentage of increase/decrease CBF relative to the initial level, the power of the endothelial NO-synthase system was estimated. It was found that the compound ZB-16 in monotherapy, and especially in combination with Metformin, significantly corrected the impaired vasodilating function of the endothelium: the CBF in the projection of the MCA was increased with the introduction of acetylcholine by 23% and 31%, and decreased with the introduction of nitro-l-arginine by 25% and 40% in animals receiving the compound ZB-16 and its combination with Metformin, respectively. At the same time, in the control group, the introduction of acetylcholine caused a minimal increase in the rate of cerebral blood flow (+15%), and the introduction of nitro-L-arginine – a minimal decrease (-18%).

Keyword: diabetes mellitus, cerebrovascular disease, endothelial dysfunction, GPR119 agonist.

Международной диабетической федерации (IDF), в 2017 году количество пациентов с сахарным диабетом во всем мире составляет 424,9 млн. В России официально, по данным Федерального регистра, сахарным диабетом страдает 3%, а реально - более 6% населения (8,5 млн) [1]. Заболеваемость сахарным диабетом во всем мире является огромной проблемой общественного здравоохранения и носит характер пандемии. Макро- и микрососудистые осложнения, которые существенно ухудшают прогноз таких больных, обусловлены развивающейся и прогрессирующей дисфункцией эндотелия. Нарушение нормального функционирования эндотелия при сахарном диабете, что проявляется в нарушении его вазомоторной, антитромботической, противовоспалительной и адгезивной функций, может привести к развитию атеросклероза и нарушению мозгового кровообращения [2].

Большинство противодиабетических средств не оказывают эндотелиопротекторного действия. Поэтому весьма перспективной может быть группа препаратов с плеiotропными эффектами, которые бы не только обладали гипогликемическим действием, но и улучшали вазодилатирующую и иные функции эндотелия при сахарном диабете. Таковыми могут являться агонисты рецептора GPR119, повышающие уровень циркулирующих инкретинов – ГПП-1 и ГИП. Агонисты рецепторов ГПП-1, действуя на рецепторы, локализованные на клетках эндотелия, активируют эндотелиальную NO-синтазу (eNOS) и повышают продукцию оксида азота, что улучшает вазодилатацию. Этот механизм действия связан с активацией сигнального пути AMPK – AMP-activated protein kinase [3]. В данном исследовании для оценки влияния соединения ZB-16 на вазодилатирующую функцию эндотелия мы выбрали модель комбинированной патологии: экспериментальный сахарный диабет и хроническое нарушение мозгового кровообращения, так как эти два состояния часто сопутствуют друг другу и нередко вытекают друг из друга [4].

Цель исследования

Изучение влияния агониста рецептора GPR119, соединения ZB-16 (Дипиарона), метформина и их комбинации на вазодилатирующую функцию эндотелия у животных с сахарным диабетом и хроническим нарушением мозгового кровообращения.

Материалы и методы исследования

Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

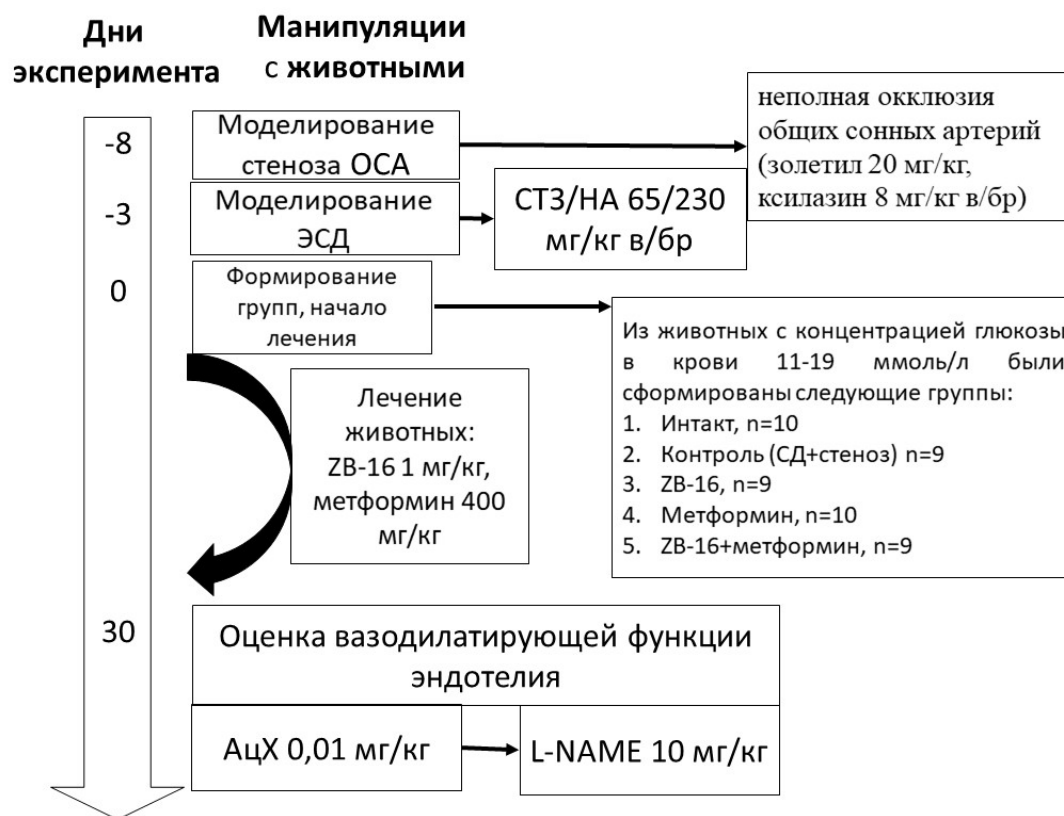


Рис. 1. Дизайн исследования. Примечание: ОСА – общие сонные артерии, ЭСД – экспериментальный сахарный диабет, АцХ – ацетилхолин, L-NAME- нитро-L-аргинин, n – число животных в группе

Исследование было выполнено на 84 беспородных крысах (ФГУП ПЛЖ «Рапполово», Ленинградская область, РФ) в возрасте 12 месяцев. Операционные процедуры проводились с использованием наркоза золетил 20 мг/кг и ксилазин 8 мг/кг внутривентриально. Для подготовки операционного поля крыс фиксировали лейкопластырем за лапы в положении на спине на хирургическом столике. Волосной покров с передней части шеи удалялся депиляционным кремом от нижней челюсти до грудины, поверхность кожи обрабатывалась раствором 70% спирта. Отступив 0,5 см от грудины, выполняли продольный разрез по срединной линии шеи длиной 2 см. Подкожно-жировой слой разрезался сосудистыми ножницами, края раны разводились в стороны посредством зажимов. Выделялся сонный треугольник, образованный сверху двубрюшной мышцей, латерально – грудино-ключично-сосцевидной мышцей и медиально – грудино-подъязычной мышцей. Далее выделялся сосудисто-нервный пучок, образованный общей сонной артерией и блуждающим нервом, который орошался 2% раствором лидокаина. Выделение общей сонной артерии производилось без прикосновения к блуждающему нерву. В качестве лигатуры использовался нерассасывающийся шовный материал. После выделения общих сонных

артерий под них подводились лигатуры и нейлоновая нить диаметром 4-0, к которой привязывался сосуд. В последующем нить извлекалась, сосуд занимал свободное пространство под лигатурой, и просвет сосуда восстанавливался на величину, равную диаметру нейлоновой нити. Аналогичная операция выполнялась на другой общей сонной артерии.

Оценка скорости кровотока по общим сонным артериям проводилась лазерной доплерографией до и после операции стенозирования сразу после наложения лигатур с помощью полиграфа MP150, модуля для лазер-доплеровской флоуметрии LDF100C и программного обеспечения AcqKnowledge 4.2 (Biopac Systems, USA). Далее операционное поле обрабатывалось раствором хлоргексидина 0,05%, рану ушивали кистетным швом, который в свою очередь обрабатывался раствором йода. После операции крысы помещались в клетки с чистыми опилками по 5-6 особей. На пол клетки в чашке Петри помещался увлажненный корм, животные находились под наблюдением в течение 3 суток (72 часа).

Через 5 дней после стенозирования общих сонных артерий (это время необходимо для восстановления животных) моделировали экспериментальный никотинамид-стрептозотоцин-индуцированный сахарный диабет [5]. Раствор никотинамида вводили внутривенно однократно (230 мг/кг), и через 15 минут стрептозотоцин (65 мг/кг). Предварительно, за 12 часов (на ночь), животные лишались пищи со свободным доступом к воде. Стрептозотоцин разводили холодным цитратным буфером (1мМ, рН 4.5) в темной таре, для разведения никотинамида использовали раствор NaCl (0,9%).

Спустя 3 суток после введения стрептозотоцина (72 часа) измеряли уровень глюкозы в крови, взятой пункцией подъязычной вены, портативным глюкометром (Contour TC Bayer, Германия), и для эксперимента отбирали животных с уровнем гликемии после 6-часовой пищевой депривации от 11 до 19 ммоль/л. Далее крыс распределяли по группам в соответствии с принципом рандомизации, но с равным средним уровнем глюкозы крови в группе ($\pm 5\%$). Животные получали лечение на протяжении 30 дней, перорально. Исследуемое соединение ZB-16 вводилось крысам один раз в сутки в дозе 1 мг/кг [6]. Препаратом сравнения был выбран метформин (400 мг/кг, per os), как лекарственное средство базисной терапии СД 2 типа [6; 7].

Оценка вазодилатирующей функции эндотелия проводилась через 30 дней после формирования экспериментальных групп (т.е. через 33 дня после моделирования сахарного диабета у животных с хроническим нарушением мозгового кровообращения) посредством измерения скорости мозгового кровотока в проекции средней мозговой артерии после внутривенного введения модификаторов синтеза эндогенного оксида азота - ацетилхолина (0,01 мг/кг) и нитро-L-аргинина в дозе 10 мг/кг [8]. Введение модификаторов синтеза оксида

азота осуществлялось после возвращения мозгового кровотока к исходному уровню [8], после чего регистрировали изменение скорости мозгового кровотока и вычисляли его изменение (в %) относительно исходного уровня.

Анализ степени изменения уровня мозгового кровотока при введении ацетилхолина и нитро-L-аргинина позволяет оценить стимулированную и базальную продукцию оксида азота, а также установить степень нарушения вазодилатирующей функции эндотелия [9].

Статистическую обработку результатов исследования проводили посредством программ Microsoft Office Excel 2013 и Prism 6 с предварительной проверкой выборок на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. В зависимости от типа данных использовали следующие методы статистического анализа: однофакторный дисперсионный анализ (One-Way ANOVA) либо ранговый однофакторный дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса с последующим применением апостериорных критериев – t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони или критерия Дана. Статистически значимыми расценивались различия при $p < 0,05$ [10; 11].

Результаты исследования и их обсуждение

У животных с сахарным диабетом, стенозом, но в большей мере с комбинированной патологией после введения ацетилхолина регистрировалось минимальное увеличение скорости церебрального кровотока ($+15 \pm 4\%$), а после введения нитро-L-аргинина – минимальное снижение ($-18 \pm 2\%$), что было значительно меньше интактной группы, в которой изменение мозгового кровотока на введение модификаторов синтеза оксида азота составило $+37 \pm 4\%$ и $-43 \pm 5\%$ соответственно (рис. 2). Из чего следует, что у животных со стенозом и в большей степени с сахарным диабетом уменьшалась эндотелийзависимая вазодилатация, но у животных с комбинированной патологией она была еще более выраженной. Данный факт может свидетельствовать о значительном нарушении функционального состояния эндотелия у животных с сахарным диабетом, что очевидно связано со снижением базальной и стимулированной продукции оксида азота.

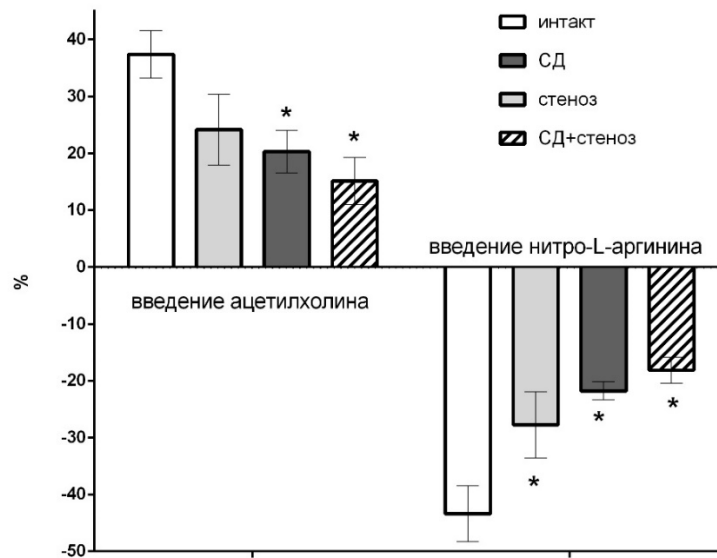


Рис. 2. Выраженность увеличения кровотока на внутривенное введение ацетилхолина и падение кровотока на введение нитро-L-аргинина; * - $p < 0,05$ относительно группы интактных животных

У животных с экспериментальным сахарным диабетом и стенозом общих сонных артерий, которым в течение месяца вводили соединение ZB-16, метформин и особенно их комбинацию, отмечено большее повышение скорости мозгового кровотока на введение ацетилхолина (на $24 \pm 2\%$, $20 \pm 4\%$ и $31 \pm 4\%$ соответственно) и большее его снижение после введения нитро-L-аргинина (на $25 \pm 4\%$, $26 \pm 3\%$ и $37 \pm 7\%$ соответственно), что отличается от контрольной группы СД+стеноз на 56% и 39% (для группы «ZB-16»), на 34% и 42% (для группы «метформин») и на 101% и 106% (для группы «ZB-16+метформин») при введении ацетилхолина и нитро-L-аргинина соответственно (рис. 3).

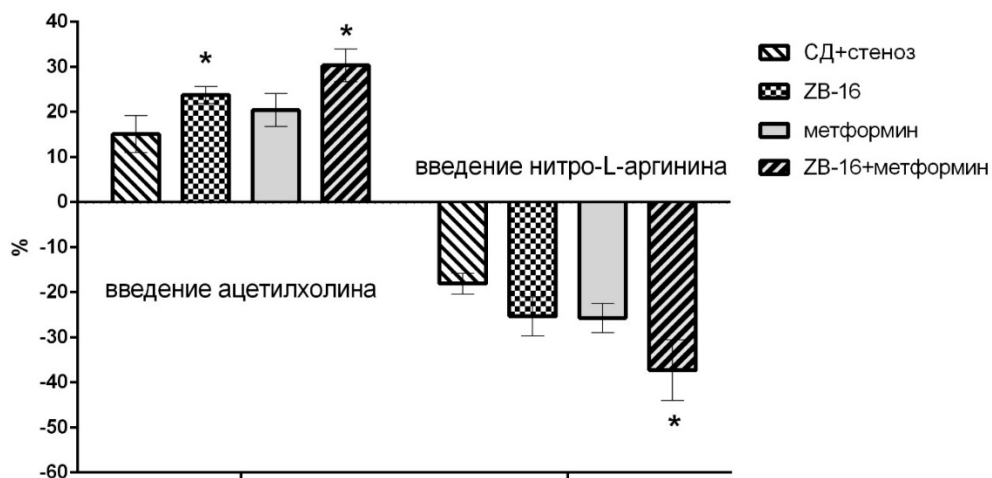


Рис. 3. Выраженность увеличения кровотока на внутривенное введение ацетилхолина и падение кровотока на введение нитро-L-аргинина у животных с сахарным диабетом и хроническим нарушением мозгового кровообращения, получавших противодиабетическую терапию в течение 4 недель; * - $p < 0,05$ относительно группы СД+стеноз

Установлено, что при сахарном диабете ухудшается эндотелийзависимая (NO-опосредованная) вазодилатация: гипергликемия повышает продукцию активных форм кислорода и блокирует активацию эндотелиальной NO-синтазы [12]. В данном исследовании у животных с сахарным диабетом наблюдалось существенное нарушение эндотелийзависимой вазодилатации, причем при комбинировании двух патологий – сахарный диабет и хроническое нарушение мозгового кровообращения – было зафиксировано еще большее ее снижение. Необходимо отметить, что применение метформина в течение 30 дней, который является препаратом первой линии в лечении сахарного диабета 2 типа [7], лишь незначительно влияло на вазодилатирующую функцию эндотелия у животных этой группы. Применение агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16 (дипиарона) – как в монотерапии, но особенно в комбинации с метформином, существенно корректировало нарушенную вазодилатирующую функцию эндотелия у животных с сахарным диабетом и хроническим нарушением мозгового кровообращения. Эти данные согласуются с результатами других исследований [3; 13], в которых показано действие ГПП-1, продукция которого повышается при стимулировании GPR119, на эндотелиальную дисфункцию. Поэтому эндотелиопротективное действие агониста рецептора GPR119 – соединения ZB-16 можно объяснить стимуляцией продукции глюкагон-подобного пептида-1 (ГПП-1). Можно также предполагать, что гипогликемическое действие соединения ZB-16 играет небольшую роль в улучшении вазодилатирующей функции эндотелия. Так, метформин, оказывающий такое же или более выраженное гипогликемическое действие, незначительно увеличивает вазодилатирующую функцию эндотелия, уступая соединению ZB-16.

Заключение

У животных с сахарным диабетом, нарушением мозгового кровообращения и еще в большей степени при их сочетании наблюдается значительное уменьшение реакции на введение ацетилхолина и нитро-L-аргинина, что, очевидно, обусловлено снижением и стимулированной, и базальной продукции оксида азота. Агонист рецептора GPR119 – соединение ZB-16 – как в монотерапии, так и в комбинации с метформином значительно улучшает нарушенную вазодилатирующую функцию эндотелия у животных с хроническим нарушением мозгового кровообращения и экспериментальным сахарным диабетом.

Список литературы

1. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным Федерального регистра сахарного диабета / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, О.К. Викулова // Сахарный диабет. – 2017. - № 20 (1). – С. 13-41.

2. Van Sloten T.T. Vascular dysfunction: At the heart of cardiovascular disease, cognitive impairment and depressive symptoms // *J. Vascular surgery*. 2017. Vol. 19. P. 18-23.
3. Koska J., Sands M., Burciu C. et al. Exenatide Protects Against Glucose- and Lipid-Induced Endothelial Dysfunction: Evidence for Direct Vasodilation Effect of GLP-1 Receptor Agonists in Humans // *Diabetes*. 2015. 64 (7). P. 2624-35.
4. Левин О.С. Когнитивные нарушения при сахарном диабете и метаболическом синдроме // *Современная терапия в психиатрии и неврологии*. - 2015. - № 4. - С. 18-25.
5. Мазо В.К. Стрептозотоциновые модели сахарного диабета / В.К. Мазо, Ю.С. Сидорова, С.Н. Зорин, А.А. Кочеткова // *Вопросы питания*. – 2016. – Т. 85, № 4. – С. 14-21.
6. Влияние агониста рецептора GPR119 на уровень глюкозы, массу тела и потребление пищи у животных с ожирением, обусловленным высокожировой и углеводной диетой / И.Н. Тюренков, Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин и др. // *Пробл. эндокр.* - 2016. - № 1. – С. 44-49.
7. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой, А.Ю. Майорова (8 выпуск) // *Сахарный диабет*. – 2017. – Т. 20, № 1 (приложение 1). – С. 1-112.
8. Изменение скорости мозгового кровообращения у крыс при экспериментальном моделировании стеноза общих сонных артерий / И.Н. Тюренков [и др.] // *Вестник ВолГМУ*. - 2017. - № 1 (61). - С. 36-39.
9. Методический подход к оценке эндотелиальной дисфункции в эксперименте / И.Н. Тюренков, А.В. Воронков // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2008. – Т. 71, № 1. – С. 49-51.
10. Гланц С. Медико-биологическая статистика / пер. с англ. – М.: Практика, 1999. – 459 С.
11. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. – М.: Медиасфера, 2006. – 312 с.
12. Антиоксидантная терапия эндотелиальной дисфункции / Тюренков И.Н. [и др.] // *Обзоры по клинич. фармакол. и лек. терапии*. - 2013. - № 1. - С. 14-25.
13. Koyama T., Tanaka A., Yoshida H. et al. Comparison of the effects of linagliptin and voglibose on endothelial function in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease: a prospective, randomized, pilot study (EFFORT) // *Heart Vessels*. 2018. P. 1-7.