

ФАРМАКОЛОГИЯ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ

ДИПЕПТИДНЫЙ МИМЕТИК ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ ГК-2 СОХРАНЯЕТ АНТИДИАБЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПРИ СИСТЕМНОМ, В ТОМ ЧИСЛЕ ПЕРОРАЛЬНОМ, ВВЕДЕНИИ У МЫШЕЙ

С. С. Ягубова, Р. У. Островская, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин¹

Дефицит нейротрофинов является одним из основных патогенетических факторов снижения пролиферации и усиления апоптоза β -клеток при диабете. Способность фактора роста нервов (NGF) поддерживать функционирование β -клеток и стимулировать секрецию инсулина позволяет предположить, что NGF может быть полезным в лечении диабета 2 типа. Однако неудовлетворительные фармакокинетические свойства нативной молекулы препятствуют ее применению. Целью данной работы стало изучение влияния оригинального димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 на эффекты диабетогенного токсина стрептозотоцина (СТЗ). Эксперименты проведены на 44 мышах C57Bl/6, разделенных на 4 группы: пассивный контроль (мыши, которым вводили физиологический раствор); активный контроль (СТЗ 100 мг/кг внутривнутрибрюшинно); опытная группа 1 (ГК-2 0,5 мг/кг внутривнутрибрюшинно в течение 14 дней до и 16 дней после СТЗ); опытная группа 2 (ГК-2 5 мг/кг per os по той же схеме). Показано, что ГК-2 ослабляет гипергликемию (максимум на 59,65 % для внутривнутрибрюшинного введения и на 42,57 % для перорального) и уменьшение массы тела (на 7,56 % для внутривнутрибрюшинного введения и на 6,53 % для перорального), вызванные введением СТЗ, и этот эффект проявляется как при внутривнутрибрюшинном, так и пероральном введении; выявлено последствие ГК-2 по обоим показателям антидиабетической активности — эффект сохранялся на протяжении всего периода наблюдения (44 дня после окончания терапии).

Ключевые слова: низкомолекулярный миметик NGF ГК-2; мыши C57Bl/6; диабет; стрептозотоцин.

ВВЕДЕНИЕ

Известна определяющая роль системы нейротрофинов в состоянии поджелудочной железы [6]. Дефицит нейротрофинов является одним из основных патогенетических факторов снижения пролиферации и усиления апоптоза β -клеток при диабете [14]. β -клетки поджелудочной железы синтезируют и секретируют фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF), который путем аутокринной регуляции стимулирует секрецию инсулина [13]. Показано, что воздействие NGF на β -клетки поджелудочной железы сопровождается фосфорилированием Trk-A рецепторов [10]. Введение индуктора NGF 4-метилкатехола (4-МС) крысам с диабетом, вызванным стрептозотоцином, ослабляет гипергликемию, уменьшает апоптоз β -клеток и окислительный стресс, активируя антиоксидантные системы (супероксиддисмутаза, глутатион пероксидаза, каталаза) [6].

Способность NGF поддерживать функционирование β -клеток и стимулировать секрецию инсулина позволяет предположить, что NGF может быть полезным

в лечении диабета 2 типа. Однако низкая биологическая устойчивость, неспособность проникать через биологические барьеры, плейотропное действие, которое может привести к таким побочным эффектам, как потеря массы и гипералгезия, ограничивают применение нативных нейротрофинов в клинической практике [11]. В настоящее время ряд научных групп ведет разработку низкомолекулярных миметиков нейротрофинов [5, 9].

В ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” на основе структуры β -изгиба 4-й петли NGF создан димерный дипептидный миметик ГК-2 (гексаметилендиамид бис-N-моносукцинил-глутамил-лизина) (HOOC-(CH₂)₂-CO-Glu-Lys-NH-)₂(CH₂)₆, который продемонстрировал высокую нейропротективную активность, антиоксидантные и регенерирующие свойства в экспериментах *in vitro*, а также эффективность на *in vivo* модели инсульта [3, 7].

Ранее на модели стрептозотоцинового диабета показана антидиабетическая активность ГК-2 на крысах [1, 2]. Целью данной работы, выполненной в развитие этих исследований, явилось изучение возможного антигипергликемического эффекта ГК-2 на мышах. Ранее эффект ГК-2 изучен только при внутривнутрибрюшин-

¹ ФГБНУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова”, Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

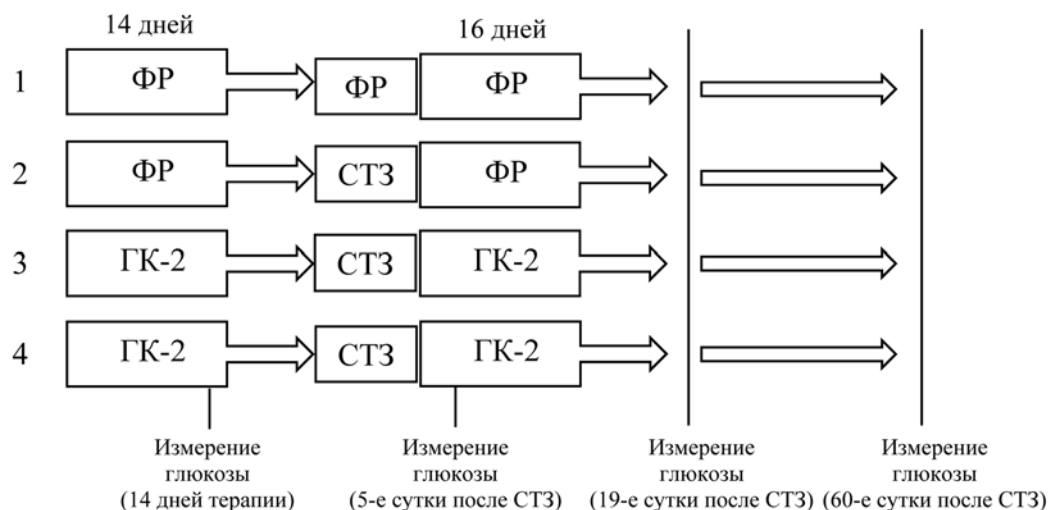


Рис. 1. Дизайн эксперимента.

1 — группа 1 (пассивный контроль, ФР); 2 — группа 2 (активный контроль), однократное внутрибрюшинное введение СТЗ в дозе 100 мг/кг; 3 — группа 3 (ГК-2 внутрибрюшинно, 0,5 мг/кг; СТЗ, однократно внутрибрюшинно); 4 — группа 4 (ГК-2 *per os*, 5 мг/кг; СТЗ, однократно внутрибрюшинно); ФР — физиологический раствор; СТЗ — стрептозотоцин.

ном введении, а его достаточно низкая молекулярная масса (831 Da) позволяет предположить наличие также и пероральной активности, в связи с этим в данной работе исследованы оба способа введения дипептидного миметика.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены на 44 самцах мышей линии C57Bl/6 с исходной массой тела 23 – 28 г, полученных из питомника “Столбовая” РАМН. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к корму (за исключением 16 ч, предшествующих введению стрептозотоцина) и воде. Соблюдали этические правила гуманного обращения с животными, изложенные в директивах Совета европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

Для моделирования диабета 2 типа животным внутрибрюшинно после 16 ч голодания вводили диабетогенный токсин стрептозотоцин (СТЗ, Sigma, USA) в дозе 100 мг/кг, эффективность которого для линии C57Bl/6 показана ранее [8].

Как следует из рис. 1, эксперименты проводили на 4 группах мышей: животным группы пассивного контроля (группа 1, $n = 10$) один раз в сутки на протяжении 31 дня вводили 0,9 % раствор хлористого натрия (физиологический раствор, ФР) внутрибрюшинно или перорально (*per os*)¹. Животным группы 2 (активный контроль, $n = 11$) в течение 14 дней вводили ФР внутрибрюшинно; на 15 сут однократно вводили СТЗ в дозе 100 мг/кг, внутрибрюшинно, после 16-часового

голодания (натошак) и далее в течение 16 дней продолжали вводить ФР. Животным группы 3 ($n = 11$) внутрибрюшинно вводили ГК-2 в дозе 0,5 мг/кг в течение 14 дней; на 15 сут (через 30 мин после введения ГК-2) животным вводили СТЗ в дозе 100 мг/кг, внутрибрюшинно, натощак; затем продолжали введение ГК-2 в течение 16 дней. Животным группы 4 ($n = 12$) ГК-2 вводили *per os* в дозе 5 мг/кг в течение 14 дней; на 15 сут животным вводили СТЗ в дозе 100 мг/кг, внутрибрюшинно, натощак (через 30 мин после введения ГК-2), затем в течение 16 дней продолжали введение ГК-2. Измерение уровня глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены мышей (глюкометр One Touch Ultra, USA), проводили перед введением СТЗ на 5, 19 и 60 сут после его введения. Взвешивание животных проводили каждые 3 – 4 дня.

Для характеристики динамики эффекта ГК-2 рассчитан относительный показатель антигипергликемической активности (Аг) по формуле:

$$Аг = \frac{\text{гл. СТЗ} - \text{гл. (СТЗ + ГК-2)}}{\text{гл. СТЗ} - \text{гл. ФР}} \times 100 \%,$$

где гл. СТЗ — уровень глюкозы в крови животных в группе активного контроля (группа 2); гл. (СТЗ + ГК-2) — уровень глюкозы крови мышей в группах 3 или 4; гл. ФР — уровень глюкозы в крови мышей в группе пассивного контроля (группа 1).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 8.0. Для оценки статистической значимости различий между группами по исследуемым параметрам использовали непараметрический метод — критерий Манна — Уитни (Mann — Whitney *U* test). Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$. Экспериментальные данные представле-

¹ Значимых различий между в/б или *per os* введением ФР у животных на протяжении всего эксперимента не выявлено, поэтому животные объединены в одну группу.

ны в виде средних значений по группе с указанием стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из данных, представленных в таблице, профилактическое введение ГК-2 в течение 14 дней не вызывало изменений уровня глюкозы в крови; показатели гликемии во всех группах были однотипными и не отличались от таковых группы пассивного контроля. Введение СТЗ вызывало выраженное повышение уровня глюкозы в крови у животных группы активного контроля. Статистически значимые различия по сравнению с группой пассивного контроля наблюдали на протяжении всего эксперимента (более 60 дней).

В группе мышей, которым вводили ГК-2, уже на 5 сут после СТЗ отмечали выраженное ослабление гипергликемии. При этом, судя по сохранению высокого показателя Аг, антигипергликемический эффект при внутрибрюшинном введении сохранялся в течение не только всего периода терапии, но и длительное время (более 40 дней) после ее отмены. Эффект перорально введенного препарата по выраженности антигипергликемического эффекта несколько уступал действию внутрибрюшинного введения (на 5 и 60 сут после введения СТЗ наблюдали значимые различия между опытными группами 3 и 4). Отсутствие эффекта ГК-2 у здоровых животных при выраженном снижении сахара у животных с диабетом позволяет оценить ГК-2 как препарат эугликемического действия.

В то время как в группе пассивного контроля имело место постепенное нарастание массы тела, введение СТЗ приводило к ее уменьшению, что полностью соответствует литературным данными [4]. ГК-2 ослаблял этот эффект СТЗ как при внутрибрюшинном (на 7,56 % на завершающей стадии эксперимента), так и пероральном (на 6,53 %) введении (рис. 2). При этом, как и в случае антигипергликемического эффекта, по влиянию на массу тела также имело место длительное последствие; эффект перорально введенного препа-

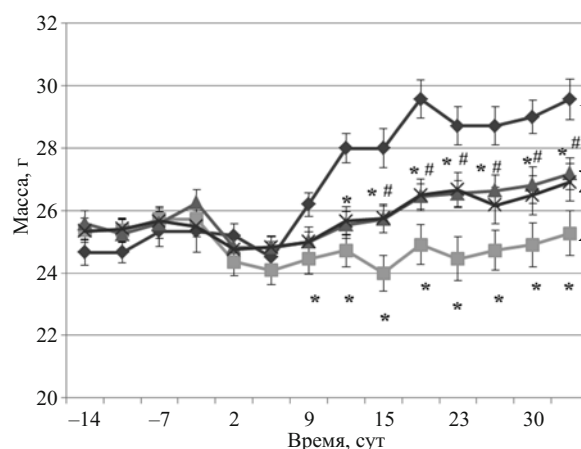


Рис. 2. Влияние ГК-2 на динамику изменения массы тела мышей с экспериментальным СД 2 ($M \pm SEM$):

1 — группа 1 (пассивный контроль, ФР); 2 — группа 2 (активный контроль), однократное внутрибрюшинное введение СТЗ в дозе 100 мг/кг; 3 — группа 3 (ГК-2 внутрибрюшинно, 0,5 мг/кг, СТЗ однократно внутрибрюшинно); 4 — группа 4 (ГК-2 *per os*, 5 мг/кг, СТЗ, однократно внутрибрюшинно); ФР — физиологический раствор СТЗ — стрептозотозин.

По оси ординат — масса тела животных, г, по оси абсцисс — время исследования, сут, при этом за точку 0 принят день введения СТЗ.

Статистически значимые изменения ($p < 0,05$): * относительно группы пассивного контроля (ФР) (Mann — Whitney *U* test), # относительно группы активного контроля (СТЗ) (Mann — Whitney *U* test).

рата не уступал по выраженности таковому для внутрибрюшинного.

Таким образом, в настоящей работе воспроизведены известные ранее эффекты СТЗ: его диабетогенные свойства, проявляющиеся в развитии гипергликемии и снижении массы тела. Показано, что антидиабетический эффект ГК-2, продемонстрированный ранее в экспериментах на крысах [1, 2], имеет место и в экспериментах на мышах.

Важно подчеркнуть, что антигипергликемический эффект ГК-2 продемонстрирован в условиях отмены препарата, спустя 44 дня после окончания терапии. Этот факт согласуется с описанным ранее для нейро-

Содержание глюкозы в крови мышей (ммоль/л): исходное (14 дней терапии физиологическим раствором или ГК-2), на 5 сут после СТЗ (20 день терапии ГК-2), 19 сут после СТЗ (3 день после прекращения терапии ГК-2) и 60 сут после введения СТЗ (44 день после прекращения терапии ГК-2) ($M \pm SEM$)

| Группа | 14 дней терапии (ФР или ГК-2) | 5 сут после СТЗ (20 дней терапии) | 19 сут после СТЗ (3 дня после отмены ГК-2) | 60 сут после СТЗ (44 дня после отмены ГК-2) |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|--|---|
| Группа 1. Пассивный контроль (ФР) | 6,56 ± 0,34 | 6,95 ± 0,40 | 7,11 ± 0,34 | 6,59 ± 0,37 |
| Группа 2. Активный контроль (СТЗ, 100 мг/кг) | 6,90 ± 0,37 | 18,39 ± 2,08* | 20,67 ± 1,51* | 16,26 ± 2,38* |
| Группа 3. ГК-2, 0,5 мг/кг внутрибрюшинно + СТЗ | 6,76 ± 0,46 | 9,05 ± 1,00*# | 8,34 ± 0,76# | 9,15 ± 0,33*# |
| Группа 4. ГК-2, 5 мг/кг <i>per os</i> + СТЗ | 6,38 ± 0,41 | 12,76 ± 1,36*#§ | 11,87 ± 1,63# | 14,76 ± 1,57*§ |
| Аг % (ГК-2, внутрибрюшинно) | | 81,6 | 90,9 | 73,5 |
| Аг % (ГК-2, <i>per os</i>) | | 49,2 | 64,9 | 15,5 |

Примечание: Аг — относительный показатель антигипергликемической активности.

Статистически значимые изменения ($p < 0,05$):

* относительно группы пассивного контроля (ФР) (Mann — Whitney *U* test);

относительно группы активного контроля (СТЗ) (Mann — Whitney *U* test);

§ статистически значимые отличия опытной группы 4 от опытной группы 3 (Mann — Whitney *U* test, $p < 0,05$).

трофинов длительным последствием [12]. Важной характеристикой ГК-2 как потенциального препарата является сохранение активности в условиях перорального введения, что составляет его принципиальное отличие от нативного пептида NGF и связано с относительно простой структурой этого димерного аналога 4-й петли NGF: молекулярная масса нативной молекулы NGF составляет 26 kDa, а изученного миметика — 831 Da.

ВЫВОДЫ

1. В опытах на мышах C57Bl/6 установлено, что димерный дипептидный миметик 4-й петли NGF ГК-2 в дозе 0,5 мг/кг внутривнутрибрюшинно ослабляет гипергликемию (максимум на 59,65 %) и уменьшение массы тела (на 7,56 %), вызванные стрептозотоцином в дозе 100 мг/кг. В условиях перорального введения (5 мг/кг) антидиабетические эффекты ГК-2 сохраняются, хотя уступают по выраженности эффекту дипептида, вводимого внутривнутрибрюшинно (максимальное достоверное ($p < 0,05$) ослабление гипергликемии на 42,57 % и уменьшения массы тела на 6,53 %).

2. Выявлено последствие ГК-2 по показателям антигипергликемической активности: при его внутривнутрибрюшинном введении через 44 дня после прекращения терапии сохраняется антигипергликемический эффект (ослабление гипергликемии на 43,73 %). В условиях перорального введения эффект последствия не проявился.

DIPEPTIDE MIMETIC OF NERVE GROWTH FACTOR GK-2 RETAINS THE ANTIDIABETIC ACTIVITY UPON INTRAPERITONEAL AND ORAL ADMINISTRATION IN MICE

S. S. Yagubova, R. U. Ostrovskaya, T. A. Gudasheva, and S. B. Seredenin

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Baltiiskaya 8, Moscow, 125315 Russia

Deficiency of neurotrophins is known to be one of the major pathogenetic factors of reduced proliferation and enhanced apoptosis of pancreatic β -cells during diabetes. The ability of nerve growth factor (NGF) to maintain the functioning of β -cells and stimulate insulin secretion suggests that NGF may be useful in the treatment of type 2 diabetes. Unfortunately, poor pharmacokinetic properties of native NGF hinder its clinical application. The aim of this study was to investigate whether the original dimeric dipeptide mimetic GK-2 attenuates the effects of diabetogenic toxin streptozotocin (STZ). The experiments were carried out on C57Bl/6 mice divided into 4 groups: passive control treated with saline; active control treated with STZ (100 mg/kg, i.p.); animals treated with 0.5 mg/kg of GK-2 (i.p.) for 14 days before and 16 days after STZ (test group 1); animals treated with 5 mg/kg of GK-2 (p.o.) at the same schedule (test group 2). GK-2 proved to be able of attenuating the hyperglycemia (by up to 59.65% and 42.57% for i.p. and p.o. administration, respectively) and body weight loss (by up to 7.65% and 6.53%, respectively) caused by STZ. These effects for both indices continued for 44 days after discontinuation of treatment.

Keywords: NGF; dimeric dipeptide mimetic, GK-2; C57Bl/6 mice; diabetes; streptozotocin.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при частичной поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00596).

ЛИТЕРАТУРА

1. И. В. Озерова, П. Ю. Поварнина, Р. У. Островская и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **76**(5), 10 – 13 (2013).
2. П. Ю. Поварнина, И. В. Озерова, Р. У. Островская и др., *Докл. акад. наук*, **449**(3), 364 – 366 (2013).
3. С. Б. Серединин, Т. А. Гудашева, Патент РФ № 2410392 (2010).
4. C. Chen, Y. Wang, J. Zhang, et al., *Dis. Model. Mech.*, **7**(6), 723 – 730 (2014).
5. A. M. Colangelo, M. R. Bianco, L. Vitagliano, et al., *J. Neurosci.*, **28**(11), 2698 – 2709 (2008).
6. S. Gezgin-Oktayoglu and S. Bolkent, *Apoptosis*, **17**(1), 14 – 24 (2012).
7. T. A. Gudasheva, P. Yu. Povarnina, T. A. Antipova, S. B. Seredenin, *Neurosci. Med.*, **5**, 101 – 108 (2014).
8. K. Hayashi, R. Kojima and M. Ito, *Biol. Pharm. Bul.*, **29**(6), 1110 – 1119 (2006).
9. F. M. Longo, Y. Xie, S. M. Massa, *Cur. Med. Chem.*, **5**(1), 29 – 41 (2005).
10. F. Miralles, P. Czernichow and R. Scharfmann, *J. Endocrinol.*, **160**(3), 433 – 442 (1999).
11. G. Pittenger, A. Vinik, *Experimental Diab. Res.*, **4**(4), 271 – 285 (2003).
12. E. Rockenstein, K. Ubhi, E. Pham, et al., *J. Neurosci Res.*, **89**(11), 1812 – 1821 (2011).
13. T. Rosenbaum, R. Vidaltamayo, M. C. Sánchez-Soto, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**(13), 7784 – 7788 (1998).
14. S. Yanev, L. Aloe, M. Fiore, G. N. Chaldakov, *World J. Pharmacol.*, **2**(4), 92 – 99 (2013).

Поступила 27.06.17