

ФАРМАКОЛОГИЯ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТА ДИМЕРНОГО ДИПЕПТИДНОГО МИМЕТИКА NGF ЧЕЛОВЕКА НА МОДЕЛИ ДИАБЕТА У КРЫС

И. В. Озерова, П. Ю. Поварнина, Р. У. Островская, Т. А. Гудашева,
Т. А. Воронина, С. Б. Середенин

Исследовали влияние аналога фактора роста нервов NGF человека — димерного дипептидного миметика ГК-2 Human (H) (гексаметилендиамид бис-N-моносукцинил-глицил-L-лизина) на динамику показателей гипергликемии и массы тела на модели сахарного диабета, вызванного стрептозотоцином. Исследуемое вещество, вводимое крысам Вистар в дозе 0,1 мг/кг внутривнутрибрюшинно в течение 14 дней до токсина и 28 дней после него, ослабляло выраженность гипергликемии и потери массы тела, вызванных диабетогенным токсином.

Ключевые слова: диабет; нейротрофины; миметик ГК-2; стрептозотоцин

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет занимает 3-е место среди основных причин смерти населения в большинстве стран мира. По оценкам ВОЗ более 180 млн, по статистике, приводимой J. E. Shaw, 220 млн человек в мире страдают данной патологией [7]. Прогнозируется, что к 2030 г. этот показатель удвоится [14]. Сахарный диабет 2-го типа является гетерогенным заболеванием, характеризующимся прогрессирующей инсулинорезистентностью, а затем неспособностью β -клеток компенсировать эту патологию [13]. β -Клетки поджелудочной железы синтезируют и секретируют NGF, который стимулирует секрецию инсулина. NGF участвует в дифференцировке и функционировании β -клеток поджелудочной железы [11, 12]. Дефицит нейротрофических факторов является одной из важных причин замедленной пролиферации β -клеток при диабете [11]. С этим дефицитом связывают развитие таких осложнений диабета, как кардиопатия, нейропатия, ретинопатия, нефропатия и др. [10].

Практическое использование NGF с целью заместительной терапии ограничено его плеiotропностью, низкой биологической устойчивостью и развитием побочных эффектов. Это обуславливает интенсивный поиск новых низкомолекулярных миметиков NGF [8].

В НИИ фармакологии имени В. В. Закусова РАМН на основе структуры β -изгиба 4-й петли крысиного NGF создан оригинальный димерный дипептидный миметик ГК-2 (rat) (гексаметилендиамид бис-N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина) [2, 5]. Пептид ГК-2 (rat) продемонстрировал высокую NGF-подобную

нейропротекторную активность в наномолярных концентрациях в экспериментах *in vitro* [1], а также проявил эффективность *in vivo* на моделях перевязки средней мозговой артерии и фотоиндуцированного кортикального тромбоза [6].

В Институте фармакологии создан также оригинальный аналог фактора роста нервов NGF человека — димерный дипептидный миметик ГК-2 Human (H) (гексаметилендиамид бис-N-моносукцинил-глицил-L-лизина) на основе структуры β -изгиба 4-ой петли NGF человека. В экспериментах с использованием модели фокальной кортикальной ишемии выявлена нейропротекторная активность соединения ГК-2 H [3].

Учитывая определённое структурное сходство ГК-2 (rat) и ГК-2 H, а также исходя из данных о наличии защитного эффекта ГК-2 (rat) у крыс при диабете [4], представляло интерес изучить действие димерного дипептидного миметика человеческого NGF ГК-2 H на модели диабета.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на самцах крыс Wistar с исходной массой тела 250–280 г (в начале эксперимента), полученных из питомника “Столбовая” РАМН. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде. Соблюдали этические правила гуманного обращения с животными, изложенные в директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

Модель диабета была воспроизведена при помощи внутривнутрибрюшинного введения стрептозотоцина (СТЗ) — токсина, повреждающего β -клетки поджелудочной железы, что ведёт к развитию гипергликемии и нарушению толерантности к глюкозе [13].

¹ Лаборатория психофармакологии (зав. — проф. Т. А. Воронина) ФГБУ “НИИ фармакологии им. В. В. Закусова” РАМН, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8.

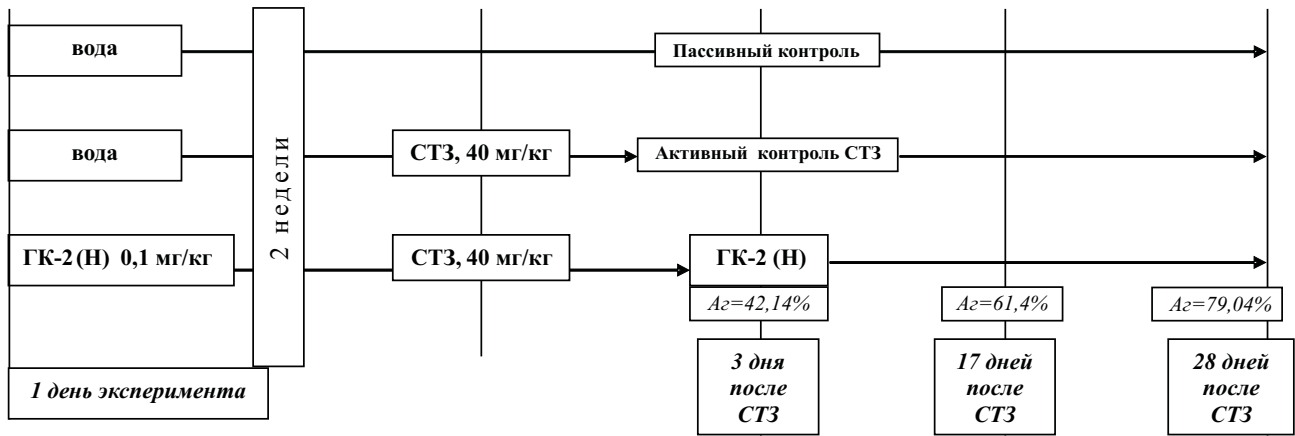


Рис. 1. Схема опыта и динамика показателя антигипергликемической активности (Аг).

Эксперименты проводили на 3-х группах крыс в течение 42 дней (рис. 1). Был изучен эффект комбинированного (профилактического и лечебного) введения ГК-2 (Н). Крысам группы пассивного контроля (груп-

па 1, N = 12) один раз в сутки на протяжении 42 дней вводили внутривентриально дистиллированную воду (ДВ). Крысам группы 2 (активный контроль, N = 13) в течение 14 дней вводили ДВ, затем на 15-ые сутки однократно был введен внутривентриально СТЗ — 40 мг/кг (“Sigma”, США), растворенный в ДВ, и далее в течение 28 дней продолжали вводить ДВ. Крысам опытной группы 3 (N = 13) вводили внутривентриально ГК-2 (Н) в дозе 0,1 мг/кг в течение 14 дней. На 15-ый день эксперимента животным вводили СТЗ (40 мг/кг), а затем продолжили введение ГК-2 (Н) в течение последующих 28 дней.

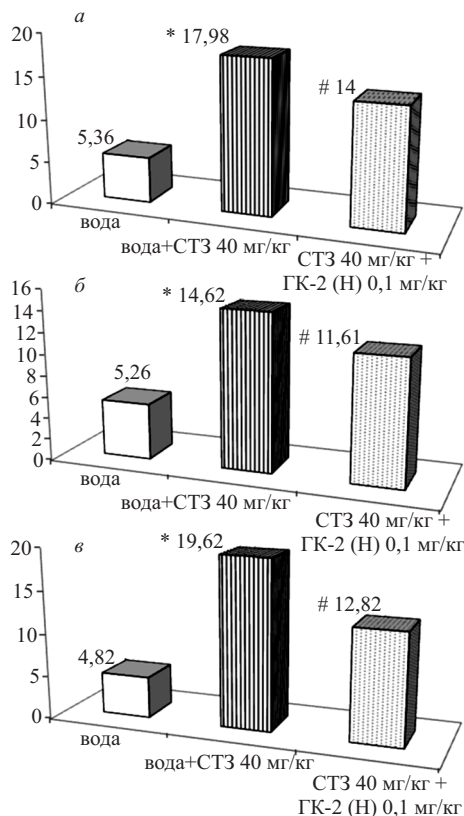


Рис. 2. Содержание глюкозы в крови крыс на 3-й (а), 17-й (б) и 28-й (в) дни после введения СТЗ.

* — достоверность различий по Манну-Уитни между пассивным контролем (вода) и активным контролем (СТЗ); # — достоверность различий между группами активного контроля (СТЗ) и опытной (введение ГК-2 (Н) 0,1 мг/кг внутривентриально, 14 дней до и 28 после введения СТЗ).

Определяли уровень глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены крыс (глюкометр One Touch Ultra, США), на 4-ые, 17-ые и 28-ые сутки после введения СТЗ. Взвешивание животных проводили каждые 3 – 4 дня.

Для оценки статистической значимости различий между группами по исследуемым параметрам использовали критерий Манна-Уитни (после предварительной оценки по критерию Крускала-Уоллиса). Данные на рисунках представлены в виде средних значений и стандартной ошибки средней (M ± SEM). Результаты считали достоверными при p ≤ 0,05.

Для характеристики динамики эффекта ГК-2 (Н) были рассчитаны значения медиан и по ним вычисляли относительный показатель антигипергликемической активности (Аг) по формуле:

$$A_g = \frac{\text{гл. СТЗ} - \text{гл. (СТЗ + ГК-2(Н))}}{\text{гл. СТЗ} - \text{гл. вода}} \cdot 100 \%,$$

где: гл. СТЗ — уровень глюкозы в крови в группе активного контроля, гл. СТЗ + ГК-2 (Н) — уровень глюкозы крови в группе 3, гл. вода — уровень глюкозы в крови в группе пассивного контроля.

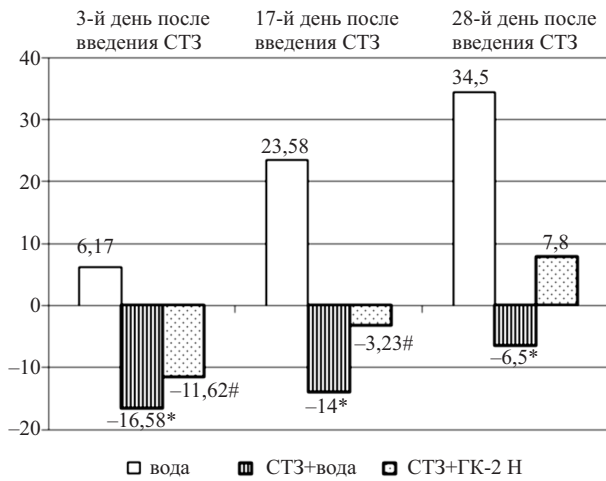


Рис. 3. Разница массы тела (Δ) между днем введения СТЗ и последующими днями (Δ массы).

* — достоверность различий по Манну-Уитни между пассивным контролем (вода) и активным контролем (СТЗ). # — достоверность различий между активным контролем (СТЗ) и терапевтическим введением препарата ГК-2 (Н) (0,1 мг/кг).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

До введения СТЗ статистически значимых различий между группами не наблюдалось, т.е. ГК-2 (Н) не влияет на содержание глюкозы в крови животных с неизменённым уровнем глюкозы. СТЗ вызвал выраженное повышение глюкозы в крови у животных группы активного контроля. Статистически значимые различия, по сравнению с группой пассивного контроля, отмечались во все сроки наблюдения: через 3 дня после введения СТЗ эти показатели составляли $17,98 \pm 1,65$ ммоль/л при уровне глюкозы для крыс группы пассивного контроля $5,36 \pm 0,12$ ммоль/л, $p \leq 0,05$ (рис. 2, а); через 17 дней — $14,62 \pm 1,75$ ммоль/л по сравнению с $5,26 \pm 0,296$ ммоль/л, $p \leq 0,05$ (рис. 2, б) и через 28 сут — $19,62 \pm 2,53$ ммоль/л по сравнению с $4,82 \pm 0,1$ ммоль/л; $p \leq 0,05$ (рис. 2, в). Таким образом, в этом эксперименте был воспроизведен известный гипергликемический эффект СТЗ. Согласно многочисленным источникам, содержание глюкозы более 13 – 15 ммоль/л рассматривается как показатель диабета [14].

Комбинированное (профилактическое и терапевтическое) введение ГК-2 (Н) снижало выраженность гипергликемии уже через 3 дня после введения СТЗ (14 дней профилактики), когда уровень глюкозы в крови составлял $14 \pm 1,96$ ммоль/л; $p \leq 0,05$ (рис. 2, а). Оно имело место также через 17 дней ($11,61 \pm 1,71$ ммоль/л) (рис. 2, б) и 28 дней терапии ($12,82 \pm 2,27$ ммоль/л; $p \leq 0,05$ по сравнению с группой активного контроля), рис. 2, в.

Расчет динамики относительного показателя антигипергликемического эффекта (Аг) свидетельствует о

постепенном нарастании его величины в течение срока наблюдения (рис. 1).

В полном соответствии с литературными данными [10, 13] введение СТЗ в наших экспериментах приводило к уменьшению массы тела крыс группы активного контроля, в то время как в группе пассивного контроля имело место её постепенное нарастание на всех этапах измерения. Вычисление разницы массы тела (г) между таковой в день введения СТЗ и в последующие дни (Δ массы) показало следующие результаты (рис. 3): на 4-ый день в группе пассивного контроля она составляла $+6,17 \pm 1,79$ г, в группе активного контроля $-16,58 \pm 2,75$ г ($p \leq 0,05$); на 17-ые сутки $+23,58 \pm 11,93$ г и $-14 \pm 8,5$ г соответственно ($p \leq 0,05$); а на 28-ые сутки $+34,5 \pm 5,25$ г и $-6,5 \pm 11,34$ г соответственно ($p \leq 0,05$).

Введение ГК-2 Н ослабляло действие токсина на массу тела крыс: на 4-ый день показатель Δ массы составлял $-11,62 \pm 2,57$ г ($p \leq 0,05$ по сравнению с крысами из группы активного контроля), на 17-ый день $-3,23 \pm 1,7$ г ($p \leq 0,05$), а на 28-ой день наблюдался противоположный эффект — крысы стали набирать вес, показатель Δ составил $+7,8 \pm 2,35$ г.

Известно, что NGF вовлечен в патогенез стрептозотоцинового диабета: внутрибрюшинное введение СТЗ крысам вызывает значительное снижение уровня NGF в поджелудочной железе, что сопровождается апоптозом β -клеток железы [15]. В то же время ослабление развития апоптоза и восстановление уровня NGF наблюдается при введении индуктора NGF — синтетазы 4-метилкатехола (4-МК) [9]. Данные литературы свидетельствуют о способности NGF поддерживать жизнеспособность β -клеток, защищать их от повреждения и стимулировать секрецию инсулина в ответ на повышение концентрации глюкозы.

В настоящей работе показано, что ГК-2(Н), подобно описанному ранее миметику крысиного NGF ГК-2 (rat) [4], ослабляет гипергликемию и препятствует снижению массы тела, вызванными введением СТЗ. Таким образом, совокупность полученных результатов позволяет предположить, что ГК-2(Н), являющийся димерным дипептидным миметиком NGF человека, оказывает антидиабетическое действие по NGF-подобному механизму.

ВЫВОДЫ

1. Оригинальный димерный дипептидный миметик NGF человека, ГК-2(Н), ослабляет гипергликемический эффект диабетогенного токсина стрептозотоцина при внутрибрюшинном введении в дозе 0,1 мг/кг.
2. ГК-2(Н) противодействует снижению массы тела на стрептозотоциновой модели диабета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Антипова, Т. А. Гудашева, С. Б. Серединин, *Бюл. экпер. биол.*, **150**(11), 537 – 40 (2010).

2. Т. А. Гудашева, Т. А. Антипова, С. Б. Середенин, *ДАН*, **434**(4), 549 – 52 (2010).
3. Т. А. Гудашева, Т. А. Романова, Ф. М. Шикова, С. О. Котельникова и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **75**(10), 12 – 15 (2012).
4. П. Ю. Поварнина, И. В. Озерова, Р. У. Островская, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин, *ДАН* (2012).
5. С. Б. Середенин, Т. А. Гудашева, Патент РФ № 2410392 (2010).
6. С. Б. Середенин, Д. Н. Силачев, Т. А. Гудашева и др., *Бюл. экпер. биол.*, **151**(5), 518 – 21 (2011).
7. А. А. Спасов и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **74**(11), 14 – 6 (2011).
8. G. Cirillo, A. M. Colangelo, M. R. Bianco, et al., *Biotechnol. Adv.*, **30**(1), 223 – 32 (2012).
9. S. Gezginici-Oktayogly, S. Bolkent, *Apoptosis.*, **17**(1), 14 – 24 (2012).
10. H. E. Han., J. R. Goss, W. F. Goins, D. Lacomis, et al., *Diabetes*, **51**(7), 2227 – 32 (2006).
11. J. H. Nielsen, E. D. Galsgaard, A. Møldrup, et al., *Diabetes*, Feb; 50 Suppl 1: S25 – 9. (2001).
12. M. Polak, R. Scharfmann, B. Seilheimer, et al., *Procl. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**(12), 5781 – 85 (1993).
13. T. Skudelski, *Physiol. Res.*, **50**(6), 536 – 46 (2001).
14. J. E. Shaw, R. A. Sicree, P. Z. Zimmet, *Diabetes Research and Clinical Practice*, **87**(1), 4 – 14 (2010).
15. V. Sposato, L. Manni, G. N. Cyaldakov, L. Aloe, *Archives Italiennes de Biologie*, 145: 87 – 97 (2007).

Поступила 05.12.12

THE EFFICACY OF HUMAN NGF DIPEPTIDE MIMETIC ON THE STREPTOZOTOCIN-INDUCED MODEL OF DIABETES IN RATS

I. V. Ozerova, P. Yu. Povarnina, R. U. Ostrovskaya, T. A. Gudashева, T. A. Voronina, and S. B. Seredenin

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

The effect of a new dimeric dipeptide mimetic GK-2 of the loop-4 human NGF (hexamethylenediamide-bis-N-monosuccinyl-glycyl-L-lysine) was investigated for the first time on the dynamics of hyperglycemia and body weight loss caused in Wistar rats by streptozotocin (45 mg/kg i.p.) Prophylactic (2 weeks before streptozotocin) daily administration combined with therapeutic (4 weeks after STZ) administration of GK-2 (0.1 mg/kg i.p.) was shown to attenuate significantly the degree of hyperglycemia and to reverse the streptozotocin-induced weight loss.

Keywords: diabetes; neurotrophins; GK-2 mimetic; streptozotocin