

# Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-7-3-6  
© Коллектив авторов, 2019

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

## НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЙ МИМЕТИК ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ (NGF) ПОВЫШАЕТ ВЫЖИВАЕМОСТЬ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ $\beta$ -КЛЕТОК НА СРЕПТОЗОТОЦИНОВОЙ МОДЕЛИ ДИАБЕТА ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

НИИ фармакологии имени В. В. Закусова, Россия, 125315, Москва.

\* e-mail: rita.ostrovskaya@gmail.com

Приведены результаты исследования антидиабетической активности миметика NGF, соединения ГК-2 (гексаметилендиамид *бис*-(N-моносукцинил-глутамил-L-лизина)) на модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета 2 типа у крыс Вистар. Показано, что 2-недельное профилактическое пероральное введение ГК-2 не вызывает снижения уровня глюкозы в крови здоровых животных, но ослабляет выраженность гипергликемии и устраняет эффект инсулинорезистентности, вызванных стрептозотоцином. Морфологический анализ поджелудочной железы животных с использованием моноклональных антител к инсулину показал, что, в то время как стрептозотоцин уменьшает количество инсулин-продуцирующих клеток поджелудочной железы, ГК-2 статистически достоверно ослабляет его повреждающий эффект, способствует восстановлению размеров панкреатических островков. Выявлен высокий уровень корреляции между выраженностью цитопротективного действия по морфометрическим показателям и степенью гипогликемического эффекта.

**Ключевые слова:** сахарный диабет; ГК-2; NGF; стрептозотоцин; инсулинорезистентность.

В отделе химии лекарственных средств “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” на основе  $\beta$ -изгиба 4-й петли NGF сконструирован дипептидный миметик, получивший рабочий шифр “ГК-2” [1] [Патент РФ № 2410392, 2010; Патент US 9,683,014 B2, 2017; Патент CN 102365294 B, 2016; 19].

ГК-2 проявляет выраженную нейропротективную активность в опытах *in vitro* на иммортализованных и первичных клеточных культурах и *in vivo* на различных моделях болезни Альцгеймера, а также фокальной и глобальной церебральной ишемии и геморрагического инсульта [2].

В соответствии с ранее предложенной концепцией сходства физиологических и патологических процессов, протекающих в нейронах и панкреатических  $\beta$ -клетках [3], целесообразно выявление антидиабетической активности веществ, обладающих нейропротективными свойствами.

В предыдущих исследованиях на крысах [4, 5] и мышах [6] антигипергликемическая активность ГК-2 продемонстрирована на модели сахарного диабета 2 типа (СД2), индуцированного стрептозотоцином (СТЗ). Целью данной работы явилось изучение эффекта ГК-2 в условиях профилактического перорального введения с оценкой показателя инсулинорезистентности (ИР) и морфологическим анализом состояния ин-

сулинпродуцирующего аппарата поджелудочной железы.

### Экспериментальная фармакологическая часть

Эксперименты выполнены на взрослых крысах-самцах линии Вистар ( $n = 40$ ) 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. Животные содержались в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 от 29 августа 2014 г. № 51. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” (протокол № 6 от 16 апреля 2018 г.).

В качестве диabetогенного токсина применяли СТЗ (Sigma, США). Дипептид ГК-2 (гексаметилендиамид *бис*-(N-моносукцинил-глутамил-L-лизина)) ( $T_{пл} = 120 - 128$  °C;  $[\alpha]_D^{25} = -44,0^\circ$  (с 0,1; вода)) (рис. 1) синтезирован в отделе химии “НИИ фармакологии имени

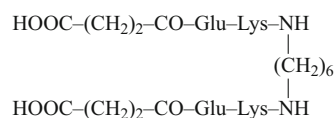
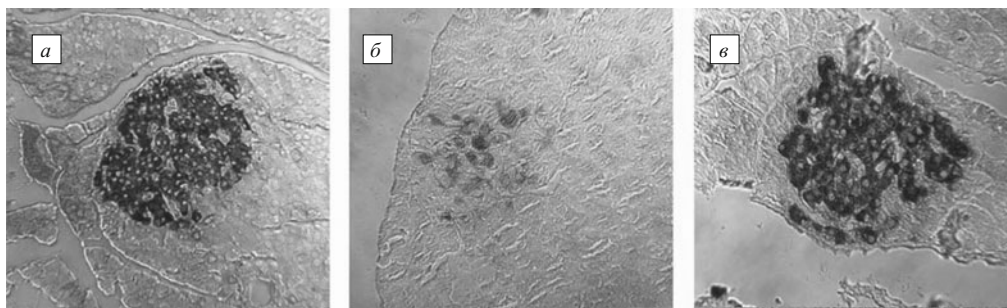


Рис. 1. Формула миметика 4-й петли NGF ГК-2.



**Рис. 2.** Панкреатические островки животных разных групп: *a* — пассивный контроль; *b* — активный контроль; *v* — крысы, профилактически получавшие ГК-2 перорально. Ув.  $\times 1600$ .

В. В. Закусова” РАМН согласно методике, описанной ранее [7].

**Дизайн эксперимента.** СД2 моделировали однократным внутривенным (в/вр) введением свежеприготовленного раствора СТЗ в дозе 45 мг/кг, растворенного в холодном цитратном буфере (pH = 4,5). Выбор этой дозы в качестве моделирующей СД2 связан с выявленным ранее фактом снижения уровня инсулина в крови на 48 % и сохранения 30 % жизнеспособных  $\beta$ -клеток в поджелудочной железе [8].

Крыс случайным образом делили на 3 группы: 1) крысам группы пассивного контроля ( $n = 12$ ) вводили физиологический раствор (ФР) перорально в объеме 2 мл/кг на протяжении 14 дней, далее цитратный буфер однократно в/вр, в последующие 7 дней — ФР перорально; 2) группе активного контроля ( $n = 14$ ) вводили ФР перорально в объеме 2 мл/кг в течение 14 дней, далее СТЗ, в последующие 7 дней — ФР перорально; 3) крысам опытной группы ( $n = 14$ ) вводили ГК-2, растворенный в ФР, перорально в дозе 5 мг/кг в течение 14 дней, предшествующих введению СТЗ, и последующих 7 дней развития СД2.

Определение содержания глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены, проводили с помощью прибора One Touch Ultra (США) дважды: по окончании 14 дней профилактического введения препаратов (для выяснения возможного гипогликемического эффекта ГК-2 у здоровых животных) и спустя 7 дней после введения

СТЗ для оценки гипогликемической активности ГК-2 и ИР.

**Тест толерантности к инсулину.** За 18 ч до проведения теста крысам ограничивали доступ к пище при свободном доступе к воде. Всем животным вводили инсулин подкожно (п/к) в дозе 0,4 МЕ/кг. Образцы крови были отобраны из хвостовой вены непосредственно перед (0), через 45 и 90 мин после введения инсулина. После завершения этой пробы животных умерщвляли декапитацией.

**Иммуногистохимический анализ панкреатических островков.** Поджелудочные железы крыс фиксировали в 10 % нейтральном формалине (pH = 7,4) (Sigma, США), обезвоживали и заливали в парафиновые блоки. Срезы толщиной 5 мкм изготавливали с помощью микротомы (Micritome Jung RM2035, Германия). Идентификацию  $\beta$ -клеток осуществляли с использованием первичных (anti-insulin GP 1:500, Abcam, Великобритания) и вторичных (anti-GP 1:500, Abcam, Великобритания), меченных пероксидазой миклоклональных антител. В качестве среды для промывки и разведения антител использовали фосфатный буфер PBS (Sigma, США). Детектирование осуществляли с использованием набора реагентов (DAB Vector Peroxidase, США).

**Микроскопический анализ.** Морфометрическое исследование проводили с использованием микроскопа Aristoplan (Leitz, Германия) с цифровой камерой DCM-800 (Микромед, Россия), персонального компь-

Таблица 1

Показатели уровня гликемии в тесте толерантности к инсулину

№	Группа	Уровень глюкозы, ммоль/л ( $M \pm m$ )		
		0 мин (исходный)	через 45 мин	через 90 мин
1	Пассивный контроль	4,3 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1 (– 53,5 %)	3,3 $\pm$ 0,2 (– 23,3 %)
2	Активный контроль	13,5 $\pm$ 2,2*	10,9 $\pm$ 1,7* (– 19,3 %)	10,0 $\pm$ 1,9* (– 25,9 %)
3	ГК-2 перорально	6,6 $\pm$ 0,5 <sup>#</sup>	3,0 $\pm$ 0,2 <sup>#</sup> (– 54,5 %)	3,0 $\pm$ 0,2 <sup>#</sup> (– 54,5 %)

\* Достоверность различий между пассивным контролем и активным контролем ( $p < 0,05$ );

<sup>#</sup> достоверность различий между опытной группой и активным контролем ( $p < 0,05$ ).

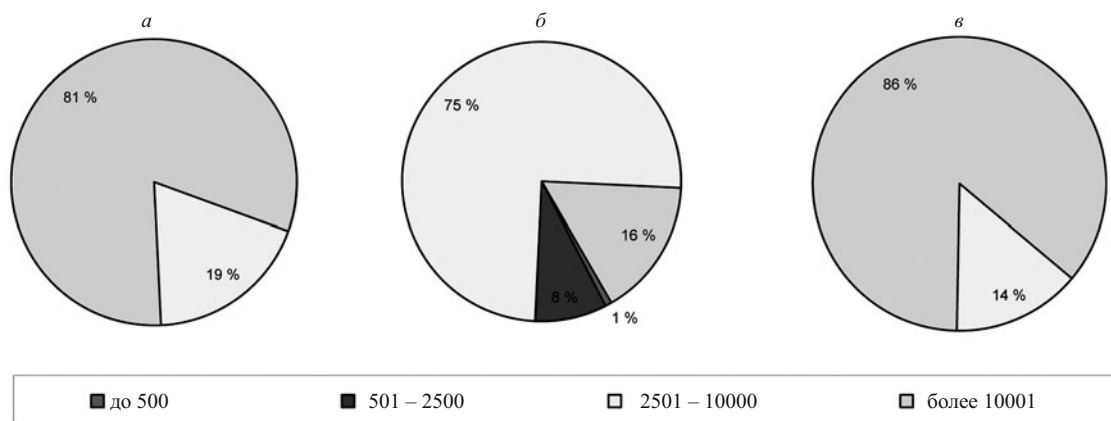
Таблица 2

Морфометрические показатели островков поджелудочной железы самцов крыс Вистар

№	Группа	Суммарная площадь $\beta$ -клеток		Средняя площадь островка, мкм <sup>2</sup>
		абсолютная, мкм <sup>2</sup>	% от среза	
1	Пассивный контроль	238149 $\pm$ 21554	22,2 $\pm$ 2,6	19292 $\pm$ 2813
2	Активный контроль	77244 $\pm$ 16899*	5,9 $\pm$ 1,6*	7256 $\pm$ 2012*
3	ГК-2	183831 $\pm$ 12906 <sup>#</sup>	16,1 $\pm$ 1,0 <sup>#</sup>	13755 $\pm$ 2050 <sup>#</sup>

\* Достоверность различий между пассивным контролем и активным контролем ( $p < 0,05$ );

<sup>#</sup> достоверность различий между опытной группой и активным контролем ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 3.** Доля островков  $\beta$ -клеток соответствующей площади,  $\mu\text{m}^2$ : *a* — пассивный контроль; *б* — активный контроль; *в* — крысы, профилактически получавшие ГК-2 перорально.

ютера и программного обеспечения ScopePhoto при увеличении  $\times 1600$ . Рассчитывали количество, площадь  $\beta$ -клеток в абсолютных единицах и отношение их площади к общей площади микропрепарата в поле зрения. Полученные микрофотографии обрабатывали в программе Image J, v.1.52, определяли среднюю интенсивность окрашивания островков, коррелирующую с содержанием инсулина в  $\beta$ -клетках.

Исходя из литературных данных о неоднородности реакции панкреатических островков различного размера на повреждающее воздействие СТЗ [9], был проведен дифференцированный анализ островков по площади с определением процентного содержания доли островков каждого диапазона размеров (менее  $500 \mu\text{m}^2$ ,  $501 - 2500 \mu\text{m}^2$ ,  $2501 - 10000 \mu\text{m}^2$ , более  $10001 \mu\text{m}^2$ ) от их общего числа.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Biostat. Характер распределения полученных данных определяли по критерию Шапиро — Уилка. В связи с наличием нормального распределения данных статистическую значимость различий между группами оценивали тестом ANOVA. Рассчитывали среднее арифметическое значение  $M$  и стандартную ошибку среднего арифметического SEM. Различие средних показателей считали достоверным при  $p < 0,05$ . Для оценки взаимосвязи непараметрических количественных признаков использовали метод ранговой корреляции Спирмэна.

### Результаты и их обсуждение

Введение ГК-2 здоровым животным на протяжении 14 дней не вызывало изменений уровня глюкозы в крови, составившего в группе пассивного контроля ( $5,4 \pm 0,3$ ) ммоль/л, активного контроля — ( $5,6 \pm 0,2$ ) ммоль/л, а при введении ГК-2 — ( $5,4 \pm 0,2$ ) ммоль/л, что свидетельствует об отсутствии у ГК-2 собственного гипогликемического эффекта.

На 21 день эксперимента проводили тест толерантности к инсулину (табл. 1). Уровень глюкозы у здоровых животных (пассивный контроль) снижался в ответ на введение инсулина на 53,5 % и быстро восстанавливался.

В группе активного контроля реакция на инсулин была слабой (снижение в среднем на 19,4 %), т.е. развивался эффект ИР. Профилактическое введение ГК-2 препятствовало развитию ИР, что проявилось в ответе на инсулин, сходным с таковым у здоровых животных (снижение гликемии на 54,5 %).

Результаты морфометрического анализа поджелудочной железы животных (табл. 2) свидетельствуют об уменьшении абсолютного и относительного количества  $\beta$ -клеток в группе нелеченных животных (активный контроль). Островки нелеченных животных с СД2 характеризуются снижением количества инсулинотитов, изменением формы клеток, наличием дистрофических изменений (рис. 2, б). Профилактическое пероральное введение крысам ГК-2 приводило к достоверному увеличению абсолютного и относительного количества  $\beta$ -клеток и площади островков и восстановлению морфологических характеристик  $\beta$ -клеток (рис. 2, в). Данные морфометрии хорошо коррелируют с показателями гликемии: коэффициент корреляции между уровнем глюкозы и суммарной площадью панкреатических  $\beta$ -клеток составил 0,863, а между уровнем глюкозы и процентным содержанием  $\beta$ -клеток в срезе — 0,899.

С целью количественной оценки интенсивности окрашивания инсулинпродуцирующих  $\beta$ -клеток проведен анализ плотности почернения микрофотографий с использованием программы Image J, v.1.45. Для образцов групп пассивного и активного контроля значения этого показателя составили ( $169617 \pm 21697$ ) и ( $101402 \pm 5581$ ) соответственно (различия между группами активного и пассивного контроля достоверны,  $p < 0,05$ ). В группе крыс с профилактическим введением ГК-2 этот показатель возрастал до ( $132133 \pm 1653$ ) условных единиц (различия между группой активного контроля и опытной группой достоверны,  $p < 0,05$ ). Таким образом, анализ интенсивности окрашивания островков подтверждает защитный эффект ГК-2 в отношении инсулинпродуцирующих клеток поджелудочной железы. Этим результатам соответствуют данные измерения размеров островков.

Показано, что, если в группе здоровых животных преобладали островки крупных размеров (доля островков площадью более 10001 мкм<sup>2</sup> – 81 %), то у нелеченных животных с СД2 преобладали мелкие островки (рис. 3). ГК-2 в условиях профилактического перорального введения полностью восстанавливал соотношение островков различных размеров до уровня пассивного контроля. По мнению Feng Z. С., изучавшего влияние фактора CD117 на пролиферацию β-клеток в островках различных размеров [9], увеличение относительного количества крупных островков свидетельствует об ослаблении выраженности апоптозного процесса.

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что ГК-2 не обладает гипогликемической активностью у здоровых животных, но обладает способностью снижать уровень гликемии у крыс с СД2, а также устранять инсулинорезистентность, характерную для СД2. Данные иммуногистохимического анализа поджелудочной железы животных свидетельствуют о наличии у ГК-2 цитопротективного действия в отношении инсулин-продуцирующих панкреатических β-клеток. Выявлено наличие высокой степени корреляции показателей морфометрии и уровня глюкозы крови. Важно подчеркнуть, что ГК-2 проявляет описанные выше эффекты в условиях перорального введения, наиболее целесообразного с целью профилактики проявлений СД2. Этим изучаемый димерный миметик NGF ГК-2 принципиально отличается от пептидных препаратов более сложной структуры, например, агонистов глюкагонподобного пептида GLP-1, проявляющих антидиабетическую активность только в условиях подкожного или внутривенного введения [10].

Таким образом, как следует из полученных данных, эффективное нейропротекторное соединение ГК-2 способно также защищать панкреатические β-клетки.

Поиск антидиабетических средств в ряду перорально-активных миметиков нейротрофинов с цитопротективным действием соответствует современным представлениям о целесообразности разработки средств, предупреждающих прогрессирующую гибель β-клеток на стадии развития СД2 [11].

Работа выполнена в рамках гос. задания 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”.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Гудашева, Т. А. Антипова, С. Б. Середенин, *Докл. акад. наук*, **434**(4), 549 – 552 (2010).
2. С. Б. Середенин, Т. А. Гудашева, *Ж. неврол. и псих.*, № 6, 63 – 70 (2015).
3. Р. У. Островская, С. В. Иванов, И. В. Озерова, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **80**(9), 20 – 28 (2017).
4. П. Ю. Поварнина, Т. А. Гудашева, О. Н. Воронцова и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **151**(6), 634 – 637 (2011).
5. С. В. Иванов, Р. У. Островская, И. В. Озерова, Н. Н. Золотов, *Материалы V съезда фармакологов России “Научные основы поиска и создания новых лекарств”*, Ярославль (2018), с. 96.
6. R. U. Ostrovskaya, S. S. Yagubova, T. A. Gudasheva, S. B. Seredenin, *Acta Naturae*, **9**(33), 94 – 102 (2017).
7. Н. М. Сазонова, А. В. Тарасюк, Д. В. Курилов и др., *Хим.-фарм. журн.*, **49**(7), 10 – 19 (2015); *Pharm. Chem. J.*, **49**(7), 439 – 448 (2015).
8. R. U. Ostrovskaya, N. N. Zolotov, I. V. Ozerova, et al., *Bul. Exp. Biol. Med.*, **157**(3), 344 – 349 (2014).
9. Z. C. Feng, L. Donnelly, J. Li, et al., *Lab. Invest.*, **92**(4), 543 – 555 (2012).
10. A. J. Scheen, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **17**(4), 485 – 496 (2017).
11. I. Song, C. Muller, J. Louw, L. Bouwens, *Cur. Drug Targets*, **16**(5), 516 – 524 (2015).

Поступила 20.01.19

## LOW-MOLECULAR-WEIGHT NGF MIMETIC UPON PERORAL ADMINISTRATION INCREASES SURVIVAL OF PANCREATIC β-CELLS ON STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES MODEL IN WISTAR RATS

R. U. Ostrovskaya\*, S. V. Ivanov, T. A. Gudasheva, and S. B. Seredenin

V. V. Zakusov State Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia

\* e-mail: rita.ostrovskaya@gmail.com

The antidiabetic activity of the low-molecular weight NGF mimetic GK-2 (hexamethylenediamide bis-N-monosuccinyl-L-glutamyl-L-lysine) was studied on streptozotocin-induced diabetes mellitus model in Wistar rats. Peroral prophylactic administration of GK-2 for two-weeks in healthy animals did not lead to the onset of hyperglycemia typical of many usual antidiabetics. GK-2 was found to attenuate the severity of hyperglycemia and to eliminate the effect of insulin resistance caused by streptozotocin. Morphological analysis of the pancreas with anti-insulin monoclonal antibodies showed that, while streptozotocin reduced the amount of insulin-producing pancreatic β-cells, GK-2 produced statistically significant attenuation of the degree of this damage and restored the size of pancreatic islets. A strong positive correlation between morphometric parameters and the glucose blood level was observed.

**Keywords:** diabetes mellitus; NGF mimetic; GK-2; streptozotocin; insulin resistance.